

VIVIANE PRODOCIMO

**A TRANSIÇÃO ENTRE HIPO- E HIPER-REGULAÇÃO OSMÓTICA DO PLASMA
EM PEIXES EURIHALINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire.

Co-Orientador: Prof. Dr. Christopher M. Wood (McMaster University)

CURITIBA

2006

VIVIANE PRODOCIMO

**A TRANSIÇÃO ENTRE HIPO- E HIPER-REGULAÇÃO OSMÓTICA DO PLASMA
EM PEIXES EURIHALINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire.

Co-Orientador: Prof. Dr. Christopher M. Wood (McMaster University)

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Carolina Arruda de Oliveira Freire pela incomparável orientação e companheirismo durante todas as etapas da execução do trabalho, pela confiança e amizade em mim depositadas.

Ao meu co-orientador Prof. Chris M. Wood por possibilitar meu estágio de doutorado em seu laboratório na McMaster University, Hamilton, Canadá.

A CAPES pelas bolsas a mim concedida no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular no Brasil e no Exterior (Estágio de Doutorado).

Ao Prof. Henry I. Spach do Centro de Estudos do Mar da UFPR, pelo auxílio na execução das coletas dos baiacus utilizados nesta tese.

À Profa. Cloris D. Faraco do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pelo aprendizado da técnica de Imunofluorescência.

Ao Prof. Silvio M. Zatana do Departamento de Patologia da UFPR, pela colaboração na execução dos experimentos de Western Blot.

Ao Fernando Galvez da McMaster University pela colaboração durante o meu estágio de doutorado no Canadá.

À Marlene Bonifácio de Camargo, secretária do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular pela eficiência na execução de todos os pedidos a ela solicitados.

À minha amiga Fabiana pela ajuda na realização da técnica de imunofluorescência.

À minha amiga Anna Raquel pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo em todas as horas que precisei.

As minhas amigas canadenses Michele Nawata e Lara Alves pela amizade, companheirismo e apoio durante minha estada no Canadá.

À Sunita Nadella secretária do Dr. C. Wood, McMaster University, por toda ajuda na minha chegada ao Canadá.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Comparativa pelos momentos agradáveis de convivência.

Aos meus pais Acir e Marlene que sempre me apoiaram e possibilitaram que eu atingisse meus objetivos.

Aos meus irmãos Marcio e Vinicius pela grande amizade e apoio.

Ao Jean R. S. Vitule, meu noivo, que foi meu companheiro, amigo e minha maior fonte de apoio e inspiração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO GERAL.....	IX
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
OBJETIVOS.....	09

CAPÍTULO 1: O COTRANSPORTADOR $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ DOS BAIACUS ESTUARINOS (*Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi*) NA HIPO- E HIPER-REGULAÇÃO DA OSMOLALIDADE DO PLASMA.....

SUMÁRIO.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3 RESULTADOS.....	22
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	34
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

CAPÍTULO 2: A Na^+, K^+ -ATPase E ATP-ase TOTAL DOS BAIACUS ESTUARINOS (*Sphoeroides testudineus* E *Sphoeroides greeleyi*) NA TRANSIÇÃO ENTRE HIPO- E HIPER-REGULAÇÃO DA OSMOLALIDADE DO PLASMA.....

SUMÁRIO.....	47
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3 RESULTADOS.....	58
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	66
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

CAPÍTULO 3: GLOMÉRULOS E TÚBULOS RENAIIS SÃO RESTRITOS AO RIM ANTERIOR NO ADULTO DO BAIACU ESTUARINO *Sphoeroides testudineus*.....79

SUMÁRIO.....	80
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAIS E MÉTODOS	83
3 RESULTADOS	86
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	91
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DOS FLUXOS UNIDIRECIONAIS DE Na⁺ E Ca²⁺ EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES TELEÓSTEOS EURIHALINOS, *Fundulus heteroclitus* E *Oncorhynchus mykiss* SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES AGUDAS NA SALINIDADE.....96

SUMÁRIO.....	97
RESUMO.....	98
ABSTRACT.....	99
1 INTRODUÇÃO	100
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
3 RESULTADOS	110
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	119
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

CONCLUSÕES GERAIS.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Fotografia de <i>Sphoeroides testudineus</i>	07
Figura 2: Fotografia de <i>Sphoeroides greeleyi</i>	07
Figura 3: Fotografia de <i>Fundulus heteroclitus</i>	08
Figura 4: Fotografia de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	08

CAPÍTULO 1

Figura 1: Osmolalidade do plasma de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> injetados com salina ou furosemida	23
Figura 2: Cloreto do plasma de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> injetados com salina ou furosemida.....	25
Figura 3: Sódio do plasma de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> injetados com salina ou furosemida.....	27
Figura 4: Hematócrito de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> injetados com salina ou furosemida.....	29
Figura 5: Conteúdo de água no músculo de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> injetados com salina ou furosemida.....	31
Figura 6: Imunofluorescência do NKCC no epitélio branquial de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	33

CAPÍTULO 2

Figura 1: Imunofluorescência da Na^+, K^+ -ATPase no epitélio branquial de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	59
Figura 2: Intensidade da fluorescência para Na^+, K^+ -ATPase branquial de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	60
Figura 3: Atividade ATPásica total das brânquias e rim de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	61
Figura 4: Triglicerídeos totais das brânquias e rim de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	63

Tabela 1: Osmolalidade e cloreto plasmáticos, hematócrito, conteúdo de água no músculo de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	65
--	----

CAPÍTULO 3

Figura 1: Fotografia de <i>S. testudineus</i> mostrando a localização do rim da cabeça e do rim caudal e micrografias de luz do rim da cabeça	88
Figura 2: Micrografias eletrônica dos túbulos do rim da cabeça de <i>S. testudineus</i>	89
Figura 3: Micrografias de luz e eletrônica do ducto mesonéfrico no rim caudal de <i>S. testudineus</i>	90

CAPÍTULO 4

Figura 1: Fluxos e concentração total de Na^+ em <i>F. heteroclitus</i>	113
Figura 2: Fluxos, concentração do plasma e total de Na^+ em <i>O. mykiss</i>	114
Figura 3: Fluxos e concentração total de Ca^{2+} em <i>F. heteroclitus</i>	117
Figura 4: Fluxos, concentração do plasma e total de Ca^{2+} em <i>O. mykiss</i>	118
Tabela 1: Concentração iônica das águas utilizadas nos experimentos de fluxo iônico unidirecional de íons Na^+ e Ca^{2+}	109

RESUMO GERAL

Os teleósteos são eurihalinos e possuem capacidade de tolerar amplas variações de salinidade. Por estarem sujeitos a variação diária de salinidade, as espécies estuarinas eurihalinas como os baiacus tropicais *Sphoeroides testudineus* (mais tolerante a redução de salinidade) e *Sphoeroides greeleyi* e o killifish temperado *Fundulus heteroclitus* são modelos interessantes para o estudo de mecanismos de osmorregulação. Além de espécies estuarinas, a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, espécie temperada dulcícola, também é um modelo muito estudado. Com o objetivo de avaliar mecanismos que ocorrem durante a transição entre hipo- (em salinidade 35‰) e hiper-regulação (em salinidade 5‰) osmótica do plasma em peixes eurihalinos, avaliou-se a participação do NKCC, da Na^+, K^+ -ATPase, das reservas metabólicas (lipídicas) e da atividade ATPásica total nos baiacus durante a hipo-regulação e hiper-regulação; descreveu-se a morfologia e a ultraestrutura do rim de *S. testudineus*; e avaliaram-se os fluxos unidirecionais de Na^+ e Ca^{2+} em *F. heteroclitus* e *O. mykiss* durante a elevação gradual da salinidade ao longo de 6 horas. Durante a hiper-regulação (5‰) e a hipo-regulação (35‰), ambas as espécies de baiacus apresentaram mecanismos de regulação osmótica semelhantes, e mesmo padrão de resposta às salinidades. O NKCC dos baiacus atuou na secreção de sal de em 35‰ das duas espécies de baiacus e na regulação do conteúdo de água das células musculares e no hematócrito de *S. testudineus*. Este transportador pode ser parcialmente responsável pela elevada capacidade de *S. testudineus* de tolerar a diluição da água do mar durante a maré baixa. Em geral foi demonstrada uma tendência a redução nas concentrações plasmáticas osmóticas e iônicas em 5‰ e controle do conteúdo de água das células, a despeito da ligeira diluição do plasma nos dois baiacus. A Na^+, K^+ -

ATPase branquial mostrou não ser um dos motivos para a maior tolerância de *S. testudineus* à água do mar diluída, por não sofrer alterações no sinal imunocitoquímico frente a hipo- e hiper-regulação. Contudo, diferenças no conteúdo de triglicerídeos das brânquias e rins podem ser parte da explicação para a tolerância diferencial.

S. testudineus revelou possuir um tipo raro de rim por apresentar rim anterior com glomérulos e túbulos renais cercados por tecido hematopoiético e um grande duto coletor convoluto denominado de duto mesonéfrico (única estrutura do rim posterior). Apesar desta morfologia pouco comum quando comparada à morfologia de outras espécies marinhas-estuarinas, o rim de *S. testudineus* atua ativamente juntamente com as brânquias no controle da homeostase do líquido extracelular.

Frente à elevação gradual de salinidade simulando o ciclo de maré enchente, *F. heteroclitus* manteve a homeostase dos íons Na^+ e Ca^{2+} sem alterar suas concentrações corporais, confirmando sua capacidade de tolerar a elevação diária da salinidade com a subida da maré em seu ambiente natural. Em salinidade elevada, *O. mykiss* perdeu a capacidade de manutenção das concentrações de Na^+ e Ca^{2+} plasmáticas devido ao aumento no influxo de ambos os íons. Este resultado mostra que a espécie estuarina ativa mecanismos de osmorregulação para manutenção da homeostase dos íons Na^+ e Ca^{2+} durante a transição gradual entre hiper- e hipo-regulação do plasma, o que não acontece com a espécie dulcícola, por esta não ser submetida regularmente a elevação de salinidade em seu ambiente natural. Com estes resultados esta tese contribuiu para o conhecimento da fisiologia da osmorregulação em peixes estuarinos diante do desafio da mudança rápida na salinidade do seu ambiente.

INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes teleósteos mantêm sua concentração osmótica em torno de 1/4 a 1/3 da concentração da água do mar. Os teleósteos marinhos são hiposmóticos em relação água do mar, apresentando concentração plasmática entre 370 e 480 mOsm/kgH₂O, e as espécies dulcícolas são hiper-osmóticas em relação ao seu ambiente e apresentam osmolalidade plasmática entre 230 e 330 mOsm/kgH₂O (Evans, 1993; Jobling, 1995; Schmidt-Nielsen, 1997).

Muitos teleósteos são eurihalinos, possuem capacidade de se aclimatizar/aclimatar às alterações de salinidade, especialmente aqueles que vivem em regiões estuarinas sujeitas às alterações diárias na salinidade da água (Jobling, 1995). Quando teleósteos são submetidos a uma alteração na salinidade, as modificações fisiológicas ocorrem em duas etapas. A primeira etapa é adaptativa, na qual ocorrem alterações na concentração iônica e osmótica do plasma após horas de exposição a alteração da salinidade. Quando um peixe marinho é transferido para água doce ocorre redução da osmolalidade do plasma pela perda de íons inorgânicos e ganho osmótico de água. A segunda etapa é regulatória, na qual a osmolalidade e as concentrações iônicas do plasma aumentam, retornando para seus níveis normais, sendo reguladas e mantidas dentro de limites estreitos em homeostase (Schmidt-Nielsen, 1997). A redução da salinidade da água acarreta em geral uma redução do número de células de cloreto das brânquias, e da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase branquial, eventos controlados pelo hormônio prolactina (Evans, 1993; Jobling, 1995; Zadunaisky, 1996).

Por outro lado, em teleósteos dulcícolas eurihalinos transferidos para água do mar, na etapa adaptativa ocorre aumento da osmolalidade do plasma e da concentração iônica devido à reversão do gradiente salino que favorece agora a entrada difusiva de sal pelo epitélio branquial. Na etapa regulatória, após alguns dias ou semanas de aclimação à água do mar, em geral é observado um aumento no número de células de cloreto e aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase branquial, eventos controlados pelos hormônios cortisol e do crescimento (Evans, 1993; Jobling, 1995; Zadunaisky, 1996).

Espécies de peixes marinhos e dulcícolas apresentam adaptações fisiológicas para lidar com variações de salinidade. Estas estão em última instância relacionadas com a absorção e secreção de uma determinada quantidade de sais e com a manutenção da água nos tecidos corporais (Zadunaisky, 1996; Wood & Pärt, 1997; Sakamoto et al., 2001). Em teleósteos marinhos, que bebem água do mar, a absorção de sal acompanhada pela água inicia-se no esôfago e estende-se até o estômago e intestino. Os rins e as brânquias são os responsáveis pela secreção do excesso de sais ingeridos a fim de manter a sua baixa concentração plasmática (hipo-regulação) (Evans, 1993; Jobling, 1995). Os teleósteos dulcícolas, por serem hiper-osmóticos ao ambiente onde vivem, realizam absorção de sal através do epitélio branquial e reabsorção de sal e excreção do excesso de água através do epitélio renal (urina mais diluída que o plasma) para a manutenção da osmolalidade extracelular (Evans, 1993; Jobling, 1995).

A secreção e absorção de sal pelo organismo dos peixes podem ser evidenciadas por alterações nos fluxos transepiteliais de íons e água. Evidências experimentais demonstram alterações nos fluxos nos epitélios branquial, renal e

do tubo digestivo no processo de transição entre hipo- (em água do mar) e hiper-regulação (em água mais diluída). Estas alterações estão associadas muitas vezes a modificações estruturais nas brânquias; alterações na atividade de enzimas; formação de proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de sal, muitas vezes com demonstração da ação moduladora de hormônios glicocorticóides e esteróides sobre estes processos (Borski et al., 1994; Gaumet et al., 1995; Jobling, 1995; Marshall, 2003).

Medidas dos fluxos iônicos unidirecionais no animal inteiro ou em células isoladas de epitélios de transporte podem indicar de maneira precisa qual a magnitude dos fluxos unitários de íons, e os fluxos que estão acarretando as eventuais modificações resultantes no líquido extracelular (LEC) (e. g. Van Der Heijden et al., 1999; Reid et al., 2003; Wood & Laurent, 2003). Quando o influxo (absorção de íons pelos epitélios para o LEC) e o efluxo (secreção de íons pelos epitélios do LEC para o meio externo) de íons são determinados durante diferentes tempos de exposição a salinidades variadas, consegue-se estabelecer como o animal está modulando seus fluxos unidirecionais em prol da homeostase do seu LEC. Juntamente com as medidas dos fluxos transepiteliais, as concentrações osmóticas do plasma indicam a capacidade de regular e manter estável a osmolalidade do plasma (Evans, 1993; Jobling, 1995; Prodocimo & Freire, 2001; 2004), eventualmente havendo ausência de fluxo resultante (estado estacionário).

Além das medidas diretas de concentrações iônicas e osmóticas plasmáticas, e dos fluxos iônicos unidirecionais, um forte indicador do estresse osmótico imposto às células e tecidos de teleósteos eurihalinos marinhos ou dulcícolas é o conteúdo de água nos tecidos musculares quando as espécies são

submetidas a ambientes hiper-osmóticos ou hipo-osmóticos. O conteúdo de água apresenta-se inversamente relacionado com a osmolalidade dos líquidos corporais, refletindo a resposta osmótica do plasma à variação de salinidade do ambiente (Jensen et al., 1998; Kelly & Woo, 1999; Claireaux & Audet, 2000; Sakamoto et al., 2001).

Em regiões litorâneas estuarinas onde a água do mar é misturada com a água de rios, a salinidade é diminuída com o ciclo de maré formando água salobra com salinidade entre 30‰ e 0,5‰ causando estresse osmótico diário aos peixes que vivem nestas regiões (Evans, 1993; Schmidt-Nielsen, 1997). O ambiente estuarino (estuário) é semelhante a uma massa de água costeira que possui ligação com o mar aberto, e é influenciada pelos movimentos das marés, que possibilita mistura da água doce com a água do mar em proporções variadas durante o dia, o que resulta em flutuação de salinidade (Odum, 1988; 1994; Mann & Lazier, 1991). O estuário poderia ser considerado apenas uma área de transição entre o ambiente marinho e o de água doce, porém suas características ecológicas o tornam um ecossistema diferenciado e exclusivo (Odum, 1988). Variações sazonais no índice pluviométrico, ciclo das marés e ação eólica são os fatores que determinam diretamente a salinidade da água do estuário. Este fatores influenciam a distribuição de suas espécies por alterações significativas na estratificação salina da coluna d'água (Odum, 1988; Mann & Lazier, 1991; Odum, 1994),

Espécies de Teleósteos Eurihalinos Estudadas

Sphoeroides testudineus Linnaeus, 1758 (baiacu-pintado) (Fig. 1), família Tetraodontidae, habita baías e estuários, chegando a penetrar em água doce

(Figueiredo & Menezes, 2000). Distribui-se de Nova Jersey nos Estados Unidos da América até o estado de Santa Catarina no Brasil. Na Baía de Paranaguá, Paraná, está entre as espécies mais abundantes nos estuários, tanto nos canais do manguezal, chamados de gamboas, quanto nas planícies de maré adjacentes. Nesta região se distribuí em locais com salinidade variando de 34 ‰ a 0 ‰, devido ao ciclo de maré (Figueiredo & Menezes, 2000; Vendel et al., 2002). *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900 (baiacu-mirim) (Fig. 2) é também uma espécie de baiacu comum no litoral brasileiro, habitando baías e estuários de águas pouco profundas. Tem distribuição latitudinal menos ampla que *S. testudineus*, de Honduras, pelo Caribe e litoral do Brasil até o estado do Paraná (Figueiredo & Menezes, 2000). Na Baía de Paranaguá, *S. greeleyi* está limitado a uma área de salinidade mais elevada que *S. testudineus*, sendo menos abundante em canais de manguezal mais internos (gamboas), onde a salinidade tende a diminuir pelo aporte de água doce dos rios que constituem o complexo estuarino (Vendel et al., 2002). Ambas as espécies de baiacus são encontradas em áreas estuarinas da Baía de Paranaguá em todos os períodos do ano nas formas adultas e juvenis, utilizando o complexo estuarino como local de reprodução (Vendel et al., 2002).

Os baiacus *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* são espécies eurihalinas reguladoras das concentrações de NaCl e de íons magnésio no plasma, tanto em água do mar (30‰) quanto em água do mar diluída (10‰). As concentrações plasmáticas destes íons são muito próximas entre as duas espécies. Contudo, estudos anteriores nos quais ambas as espécies foram expostas às salinidades de 35‰ e 5‰ por períodos de 6 horas e 15 dias, indicaram que *S. testudineus*, mais resistente a salinidades menores quando comparado a *S. greeleyi*, sobreviveu 15 dias em 5‰ de forma totalmente

compatível com sua distribuição na natureza. *S. greeleyi* sobreviveu por 6 horas e 5 dias a salinidade de 5‰ (Prodocimo & Freire, 2001; 2004).

A terceira espécie estuarina estudada neste trabalho foi o “killifish” *Fundulus heteroclitus* (Fig. 3), pertencente à família Ciprinodontidae. É uma espécie extremamente eurihalina que vive em planícies de maré e estuários ao longo de toda costa norte americana, onde está sujeita a variações diárias de salinidade. Esta espécie, bem como outras espécies pertencentes a este gênero, toleram transferências abruptas entre a água doce e a água do mar, sobrevivendo em salinidades entre 0 ‰ 120 ‰ (Feldmeth & Waggoner III, 1972; Griffith, 1974). A espécie *F. heteroclitus* tem sido intensamente estudada para a determinação de mecanismos básicos da osmorregulação de teleósteos eurihalinos (Jacob & Taylor, 1983; Marshall et al., 1999; Marshall et al., 2000; Daborn et al., 2001; Katoh et al., 2003; Marshall, 2003; Wood & Laurent, 2003).

Além da espécie estuarina *F. heteroclitus*, um outro modelo amplamente estudado de peixe eurihalino é a truta arco-íris. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Fig. 4) é uma espécie dulcícola que tolera até salinidades próximas a 24‰ em aclimação gradual (Richards et al., 2003). Os salmonídeos em geral são amplamente estudados quanto aos seus mecanismos de transporte de íons, sendo excelentes modelos de teleósteos dulcícolas eurihalinos para estudos sobre osmorregulação em diferentes salinidades (e.g. Perry & Flik, 1988; Perry & Laurent, 1989; Perry et al., 1996; Galvez et al., 2002; Reid et al., 2003; Hawkings et al., 2004).



Figura 1: Exemplar adulto de *Sphoeroides testudineus*.
Barra de escala: 2 cm.

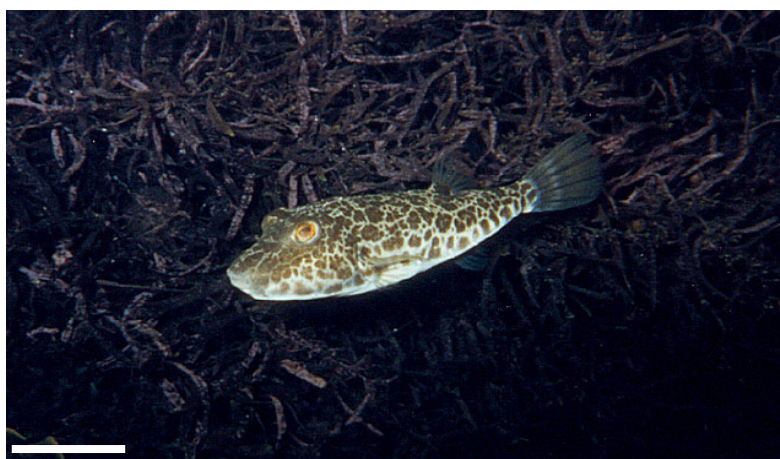


Figura 2: Exemplar adulto de *Sphoeroides greeleyi*.
Barra de escala: 2 cm.



Figura 3: Exemplar adulto de *Fundulus heteroclitus*.
Barra de escala: 0,5 cm.

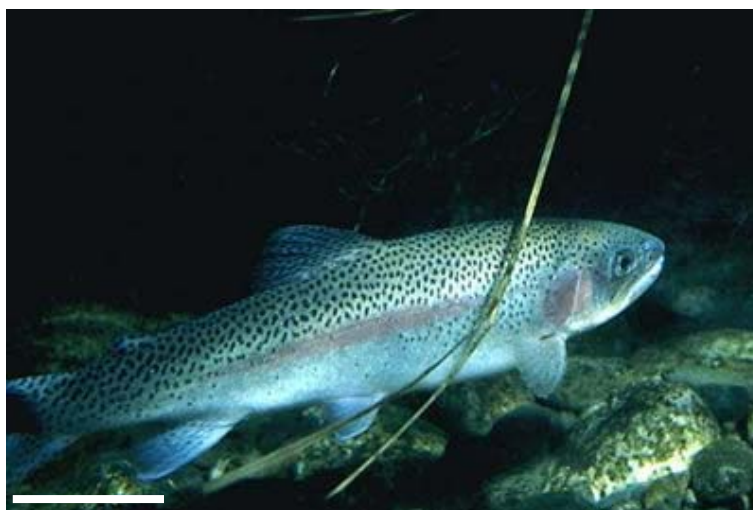


Figura 4: Exemplar adulto de *Oncorhynchus mykiss*.
Barra de escala: 5 cm

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever a ultraestrutura e a morfologia do rim e avaliar os mecanismos fisiológicos de regulação osmo-iônica frente à diluição da água do mar em três espécies eurihalinas estuarinas potencialmente sujeitas a redução da salinidade no seu ambiente natural durante a descida de maré, e em uma espécie eurihalina dulcícola não sujeita a variação de salinidade no ambiente natural.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o papel do co-transportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) na tolerância diferencial de *S. testudineus* e *S. greeleyi* à diluição da água do mar;
2. Avaliar o papel da Na^+ , K^+ -ATPase, da atividade ATPásica total e da reserva metabólica de lipídeos na brânquia e no rim, na tolerância diferencial de *S. testudineus* e *S. greeleyi* à diluição da água do mar;
3. Descrever a morfologia e a ultraestrutura do rim e dos túbulos renais de *S. testudineus*;
4. Determinar os fluxos unidirecionais de Na^+ e Ca^{2+} no peixe inteiro (*F. heteroclitus* e *O. mykiss*) durante a elevação gradual da salinidade ao longo de 6 horas simulando o ciclo de maré em ambiente estuarino.

**CAPÍTULO 1: O COTRANSPORTADOR $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ DOS BAIACUS
ESTUARINOS (*Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi*) NA HIPO- E
HIPER-REGULAÇÃO DA OSMOLALIDADE DO PLASMA¹**

¹Artigo publicado no Comparative Biochemistry Physiology C 142: 347-355, Prodocimo & Freire, 2006.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3 RESULTADOS	22
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

Os baiacus *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* são espécies estuarinas com eficiente capacidade osmorregulatória. Contudo, *S. testudineus* tolera maior diluição da água do mar quando comparado a *S. greeleyi*. Este estudo teve como objetivo testar a participação do NKCC na tolerância diferencial à redução da salinidade, através da análise *in vivo* da injeção de furosemida (inibidor do NKCC) durante a hipo-regulação (em salinidade 35‰) e hiper-regulação (em salinidade 5‰). Após a exposição às salinidades experimentais por 6 horas ou 5 dias, amostras de sangue foram coletadas para determinação da osmolalidade, concentração de cloreto e sódio plasmáticos e hematócrito, e amostras de músculo para a determinação do conteúdo de água. Em ambas as espécies, a injeção de furosemida levou ao aumento da osmolalidade e sódio plasmáticos em 35‰ e diminuição da osmolalidade e cloreto plasmáticos em 5‰, quando comparados ao controle injetados com salina; levou à redução dos valores de hematócrito em ambas às salinidades e ao aumento do conteúdo de água no músculo em 5‰ e diminuição em 35‰ em *S. testudineus*. Os resultados obtidos são compatíveis com o envolvimento do NKCC branquial para a secreção de sal (NaCl) em 35‰, em ambas as espécies, e seu papel fundamental na regulação de volume celular nas células sangüíneas e nas células musculares de *S. testudineus*, em ambas as salinidades, o que pode explicar parcialmente a maior capacidade de *S. testudineus* de tolerar a diluição da água do mar durante a maré baixa quando comparado a *S. greeleyi*.

ABSTRACT

The pufferfishes *Sphoeroides testudineus* and *Sphoeroides greeleyi* are estuarine species that osmoregulate efficiently, but *S. testudineus* tolerates seawater dilution to a much higher degree than *S. greeleyi*. This study aimed at testing whether NKCC is involved with their differential tolerance of sea water dilution, through the analysis of *in vivo* furosemide (NKCC inhibitor) injection both on hypo-regulation (in 35‰ salinity) and hyper-regulation (in 5‰ salinity). After exposure for 6 hours or 5 days to both salinities, blood samples were obtained for determination of plasma osmolality, chloride, sodium and hematocrit, and muscle samples for determination of water content. Furosemide injection led to increased plasma osmolality and sodium in 35‰ and decreased osmolality and chloride in 5‰, when compared to saline-injected controls for both species. Furosemide injection led to hematocrit reduction in both salinities, and muscle water content increase in 5‰ and decrease in 35‰ in *S. testudineus*. The results are compatible with NKCC working in branchial NaCl secretion in 35‰, in both species, and a higher role in cell volume regulation in blood and muscle cells of *S. testudineus*, in both salinities, which could partially explain the stronger capacity of *S. testudineus* to tolerate seawater dilution during low tide.

1 INTRODUÇÃO

Teleósteos marinhos são hipo-osmóticos a água do mar e suas brânquias são responsáveis pela manutenção da homeostase do plasma secretando o excesso de sal ingerido (Evans, 1993; Jobling, 1995). As células ricas em mitocôndrias (células de cloreto) do epitélio branquial são as principais responsáveis pela secreção de cloreto na água do mar e são auxiliadas pelas células acessórias adjacentes, separadas pela via paracelular permeável ao sódio. As células de cloreto e as acessórias são ricas em mitocôndrias associadas a um denso sistema tubular de membranas (continuação da membrana basolateral), rico em proteínas transportadoras (Philpott, 1980; Jobling, 1995; Perry, 1997).

O cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ (NKCC) está entre as mais relevantes proteínas de transporte nas brânquias de peixes. Sua isoforma secretória NKCC1 está localizada no sistema basolateral de membranas nas células de cloreto no epitélio branquial dos teleósteos (Lytle & Forbush, 1992a,b; Lytle et al., 1995; Marshall et al., 2002a; Marshall, 2003; McCormick et al., 2003; Scott et al., 2004). O NKCC é um transportador ativo secundário, encontrado em membranas celulares de uma grande variedade de epitélios de transporte de sal, e também em células animais não epiteliais, onde atua na homeostase do volume celular (Russell, 2000). A isoforma absorptiva NKCC2 está localizada nas membranas apicais das células epiteliais. Ambas as isoformas podem ser inibidas pelos “diuréticos de alça” bumetanida e furosemida (Forbush et al., 1992; Lytle & Forbush, 1992a; Lytle et al., 1995; Mount et al., 1998; Russell, 2000). Em telósteos em geral, a presença do NKCC tem sido demonstrada nos epitélios

branquial e opercular (Pelis et al., 2001; Pelis & McCormick, 2001; Cutler & Cramb, 2002; Marshall et al., 2002a; McCormick et al., 2003; Scott et al., 2004; Marshall et al., 2005), bem como nos epitélios renal (Cutler & Cramb, 2002), e intestinal (O'Grady et al., 1987; Marshall et al., 2002b).

Em teleósteos marinhos eurihalinos a expressão do NKCC1 foi reduzida (*down regulated*) em água salobra onde não há necessidade de secretar sal (McCormick et al., 2003; Scott et al., 2004), ou quando há necessidade de absorver sal em água doce ou água do mar muito diluída (Pelis et al., 2001; Scott et al., 2004). Associada à redução na expressão do NKCC, a regulação da secreção de sal pelo epitélio branquial ou opercular em curto período de tempo envolve a redistribuição deste transportador da membrana basolateral das células de cloreto quando em água do mar para o interior das células em água doce (Marshall et al., 2002a). Ocorre ainda defosforilação do NKCC por uma proteína do tipo fosfatase (Marshall, 2003). O mesmo fenômeno regulatório se aplica às células de cloreto, com redução na condutância apical pelos canais de cloreto CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, canais de cloreto apicais responsáveis pelo transporte de cloreto para fora da célula) (Marshall, 2003; McCormick et al., 2003; Scott et al., 2004). Ambos os transportadores (NKCC e CFTR) juntos são responsáveis pela secreção vetorial transcelular de cloreto nas brânquias dos teleósteos marinhos (e.g., Marshall, 2003).

O baiacu *Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758 é uma espécie abundante em baías e estuários ao longo da costa do Brasil, e ocorre em água com salinidade entre 0 e 34‰ (Nardi, 1999; Figueiredo & Menezes, 2000). *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900 também é estuarina, mas restrita a áreas com salinidade mais elevada que *S. testudineus* (~30‰), não permanecendo no

estuário durante a descida da maré (Figueiredo & Menezes, 2000; Vendel et al., 2002). Ambos os baiacus são eurihalinos, apresentando capacidade similar de regulação da osmolalidade e dos íons plasmáticos em água do mar (Prodocimo & Freire, 2001; 2004). No entanto, em salinidades reduzidas, eles apresentam comportamento diferenciado, com *S. testudineus* sendo mais tolerante quando comparado a *S. greeleyi* (Prodocimo & Freire, 2001). Este padrão de tolerância é compatível com sua distribuição na natureza (Figueiredo & Menezes, 2000; Vendel et al., 2002).

O presente estudo foi conduzido para investigar se o NKCC apresenta algum papel na tolerância diferencial de *S. testudineus* e *S. greeleyi* a diluição da água do mar. O sinal da presença do NKCC em ambas as espécies foi aqui avaliado usando duas técnicas experimentais: injeção de furosemida *in vivo*, e imunocitoquímica da brânquia. O efeito da injeção do inibidor foi avaliado nas brânquias, representado pela osmolalidade e concentração de cloreto e sódio plasmáticos (ação do NKCC na osmorregulação), e nos tecidos, representado pelo hematócrito e conteúdo de água no tecido muscular (ação do NKCC na regulação do volume celular).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

S. testudineus adultos (15 ± 1 cm de comprimento, 40 ± 1 g de peso) e *S. greeleyi* (10 ± 1 cm de comprimento, 20 ± 1 g de peso) foram coletados na gamboa do rio Baguaçu ($25^{\circ} 33' 6,33''\text{S}$, $48^{\circ} 23' 41,63''\text{W}$), na margem sul da Baía de Paranaguá, Estado do Paraná, Brasil, entre Setembro de 2002 e Maio de 2004.

Os peixes foram coletados durante a maré enchente utilizando rede de espera tipo fyke cruzando o canal da gamboa. A rede permaneceu instalada por 6 horas até o pico de maré enchente, quando foi feita a coleta da rede. Os animais foram transferidos para galões plásticos com água do local da coleta e aeração constante. A salinidade da água foi verificada (refratômetro Shibuya S-28, Japão) imediatamente após a coleta dos animais, e variou entre 29‰ e 30‰ nas datas de coleta. Os peixes foram transferidos para o laboratório, onde foram aclimatados por 7 dias em tanque estoque de 250 l com filtro biológico, salinidade de 30‰, temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e aeração constante. Durante o período de aclimação e o período experimental de 5 dias, os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com camarões frescos e minhocas.

Experimentos

Espécimes de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram expostos por 6 horas ou 5 dias à água do mar com salinidade 35‰ e à água do mar diluída, com salinidade 5‰. A água do mar com salinidade 35‰ foi preparada misturando a água de salinidade 30‰ com água do mar concentrada após congelamento. Os animais experimentais submetidos à salinidade 35‰ foram diretamente transferidos do tanque estoque de salinidade 30‰ para os aquários experimentais de salinidade 35‰. A água do mar 30‰ foi diluída para 5‰ adicionando-se água da torneira sem cloro e filtrada (série de filtros de celulose e carvão ativado). A água do mar foi diluída *overnight* de 30‰ para 10 - 12‰ ao longo de 4 horas (com fluxo de 0,7 ml/seg) para evitar choque osmótico nos peixes expostos a 5‰. Os peixes permaneceram por 10 - 12 horas em 10 - 12‰, e foram transferidos para 5‰. Os experimentos foram realizados em aquários de 30 l com aeração constante,

temperatura de 21 ± 1 °C e número máximo de 3 peixes por aquário experimental, com duplicatas independentes, até a obtenção de um número adequado de animais para cada parâmetro. Após um período de 6 horas ou 5 dias nas salinidades experimentais (5‰ e 35‰), os peixes foram anestesiados com benzocaína dissolvida em etanol na água do aquário, com concentração final de 80 mg/l. Esta dose de benzocaína foi previamente testada para garantir a total recuperação dos animais. Após a anestesia completa, os peixes foram injetados com 1 ml de furosemida Aventis 10 mg/ml, ~30 mM em NaCl 300 mM. A dose de furosemida estimada foi de: 0,75 μ mol/g de peso corporal de *S. testudineus* e 1,5 μ mol/g de peso corporal de *S. greeleyi*. Esta diferença na dose de furosemida injetada impediu comparação direta entre os valores de ambas as espécies. Os animais controles foram injetados com 1 ml de salina 300 mM NaCl, e todos os peixes receberam injeção muscular dorsolateral. Esta dose de furosemida foi a menor dose encontrada em testes preliminares capaz de induzir alterações significativas na osmolalidade do plasma, sendo letal após 90-120 minutos da injeção. Os peixes foram anestesiados antes da injeção para reduzir o estresse causado pela contenção manual. Após a injeção, os animais experimentais e os controles permaneceram em aquários individuais por 1 hora, quando foram novamente anestesiados e abertos por incisão ventral.

Ensaio

Após a incisão ventral, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram centrifugadas por 10 min (2,100 xg) e as amostras de plasma foram imediatamente congeladas a -20°C até a realização dos ensaios para a determinação da osmolalidade, dos

íons cloreto e sódio. O sangue foi coletado também usando capilar de vidro para determinação do hematócrito e finalmente um fragmento de músculo (~0,40 g) foi dissecado para a determinação do conteúdo de água.

A osmolalidade do plasma foi determinada utilizando micro-osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, USA); a concentração de cloreto foi determinada por colorimetria utilizando kit comercial (Labtest, Brasil), lido por absorbância em 470 nm; a concentração de sódio foi determinada através de fotometria de chama em amostras diluídas 1:1000 (Fotômetro Micronal 462, Brasil). O hematócrito foi determinado após centrifugação a 12000 rpm por 10 min em centrífuga de hematócrito (Presvac, Argentina). Para a determinação do conteúdo de água no músculo, amostras de músculo da região dorsal foram pesadas em balança analítica e desidratadas a 100 °C por 24 horas. As amostras foram pesadas novamente e o conteúdo total de água foi expresso em percentagem de peso úmido.

Imunocitoquímica do NKCC

Para a detecção do NKCC por imunofluorescência, grupos de animais não injetados foram do mesmo modo expostos por 6 horas ou 5 dias às salinidades experimentais de 5‰ ou 35‰. Os peixes foram anestesiados como descrito anteriormente, e o segundo arco branquial direito foi removido. Os filamentos branquiais foram fixados em paraformaldeído 2% em PBS por 3 horas, em seguida foram incubados em tampão fosfato (PBS) com sacarose 5% por 2 horas, e incubados em PBS com sacarose 15% *overnight* a 4°C. Os filamentos foram embebidos em OCT (crioprotetor Tissue – Tek), e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo transferidos para freezer a -20°C. Os blocos foram

cortados em criostato CTD (IEC – International Equipment Company, EUA), e cortes de 10-12 μm foram colocados em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão dos cortes. Os cortes foram lavados com PBS e PBS com glicina 0,1 M, foram bloqueados em PBS com soro albumina bovina (BSA) 1%, e foram incubados em câmara úmida a 4°C *overnight*, com anticorpo primário anti-NKCC (T4, anti-cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ da cripta colônica humana, células T84), obtido do Banco de Estudos de Desenvolvimento de Híbridoma, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Iowa, EUA. Este anticorpo foi produzido em camundongo, e foi utilizado com diluição de 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS, bloqueados por 15 min com BSA 1%, e então incubados por 1,5 horas, em câmara úmida no escuro a temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-camundongo IgG produzido em cabra conjugado com fluorocromo fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA), diluído 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Os cortes foram lavados com PBS, rapidamente lavados com água destilada e finalmente montados com fluormount e lamínula protegidos da luz. As lâminas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot.

Análise das Imagens

A intensidade da fluorescência nos filamentos branquiais de *S. testudineus* foi qualitativamente avaliada através de fotomicrografias escaneadas obtidas com a utilização de filme fotográfico colorido Asa 800. Para *S. greeleyi* as imagens dos filamentos branquiais foram obtidas através de um sistema eletrônico de captura de imagem (CCD monochromatic 1280 x 1024 pixels, 16 bits/pixel, Case Data Manager, Applied Spectral Imaging) acoplado ao fotomicroscópio. As imagens

dos filamentos de ambas as espécies foram analisadas através do programa Sigma Scan-Pro (Jandel Corporation). As imagens digitais foram convertidas em escala de cinza, o contraste foi ajustado para melhorar o sinal e reduzir a fluorescência de fundo. Para cada espécie e condição experimental (salinidade/tempo), foram usados 5-7 animais independentes e 9-13 lamelas secundárias dos cortes sagitais foram analisadas aleatoriamente.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SigmaStat versão 2.03, com nível de significância de 0,05. ANOVA de duas vias, foi realizada para osmolalidade, cloreto e sódio plasmáticos, hematócrito e conteúdo de água no músculo. Duas ANOVAS foram realizadas separadamente para cada espécie, uma para cada tempo de exposição (6 horas ou 5 dias). Os dois fatores em cada ANOVA foram o fator “tratamento” (2 níveis: injetado com furosemida ou injetado com salina), e “salinidade” (2 níveis: 5‰ e 35‰). O teste *post hoc* utilizado foi o de Tukey para localizar as diferenças significativas. As diferenças entre as salinidades 5‰ e 35‰, para os peixes injetados com furosemida não foram indicadas por não terem significado. Teste t de *Student* não pareado foi utilizado para determinar o efeito do tempo, comparando os dados de 6 horas e 5 dias, para cada espécie e tratamento.

3 RESULTADOS

Osmolalidade

A injeção de furosemida em *S. testudineus* exposto a 35‰ levou ao aumento da osmolalidade do plasma após 6 horas ($389 \pm 14,5 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) e após 5 dias ($395 \pm 14,8 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$), quando comparados aos respectivos controles injetados com salina (6 horas: $337 \pm 4,5 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$, 5 dias: $322 \pm 5,5 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) (Fig. 1A). O único efeito do tempo (valor em 5 dias diferente do valor em 6 horas) na osmolalidade do plasma de *S. testudineus* foi observado para os peixes injetados com salina expostos a 35‰ por 5 dias, com valor inferior ao dos peixes do grupo 6 horas (Fig. 1A). Basicamente o mesmo padrão foi encontrado para a osmolalidade do plasma de *S. greeleyi* (Fig. 1B). A diferença importante aqui foi que a injeção de furosemida afetou a osmolalidade do plasma de *S. greeleyi* em 5‰, reduzindo seus valores (Fig. 1B), para ambos os tempos: de $320 \pm 4,9$ para $275 \pm 7,3 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ (6 horas), e de $329 \pm 14,4$ para $289 \pm 3,5 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ (5 dias). A injeção de furosemida e elevou a osmolalidade plasmática de *S. greeleyi* em 35‰ de $358 \pm 18,3$ para $425 \pm 21,0 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ (6 horas), e de $361 \pm 10,5$ para $414 \pm 10,4 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ (5 dias) (Fig. 1B).

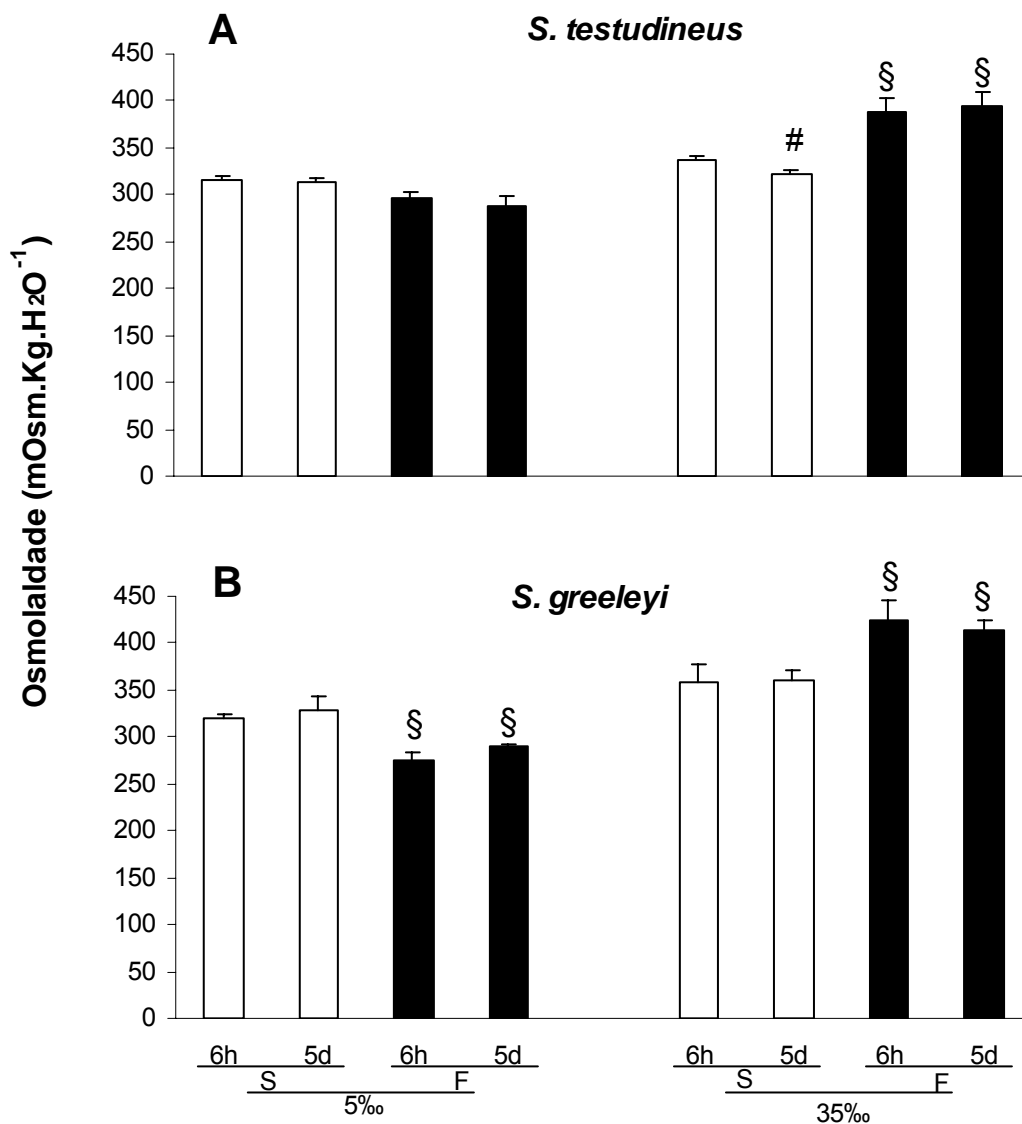


Figura 1. Osmolalidade do plasma (média \pm erro padrão, mOsm.kg H₂O⁻¹) de *S. testudineus* (A, n: 6-8) e *S. greeleyi* (B, n: 6-8) expostos por 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) às salinidades 5‰ ou 35‰, e injetados com salina (S, barras brancas) ou furosemida (F, barras pretas). § = efeito da injeção (injeção de furosemida \neq injeção de salina, mesma salinidade, mesma espécie, mesmo tempo); # = efeito do tempo (5d \neq 6h, mesma salinidade, mesma injeção, mesma espécies) sempre com $P < 0,05$.

Cloreto

As concentrações de cloreto plasmáticas de *S. testudineus* injetados com furosemida e mantidos em 5‰, após 6 horas ($118 \pm 4,8$ mM) e após 5 dias ($117 \pm 7,5$ mM), foram menores que os respectivos valores dos controles injetados com salina mantidos em 5‰ por 6 horas ($148 \pm 8,0$ mM) ou 5 dias ($146 \pm 5,2$ mM) (Fig. 2A). Os valores obtidos para *S. greeleyi* injetados com salina em 5‰ foram menores que os valores dos injetados com salina em 35‰, para ambos os tempos de exposição: $156 \pm 11,1$ mM em 5‰ e $192 \pm 9,8$ mM em 35‰ (6 horas), $152 \pm 8,0$ mM em 5‰ e $178 \pm 10,0$ mM em 35‰ (5 dias) (Fig. 2B). Adicionalmente, a injeção de furosemida levou a redução dos valores de cloreto plasmático em *S. greeleyi* após ambos os tempos (6 horas: $126 \pm 5,8$ mM e 5 dias: $130 \pm 6,8$ mM) em 5‰, em relação aos grupos injetados com salina, como observado para *S. testudineus* (Fig. 2B).

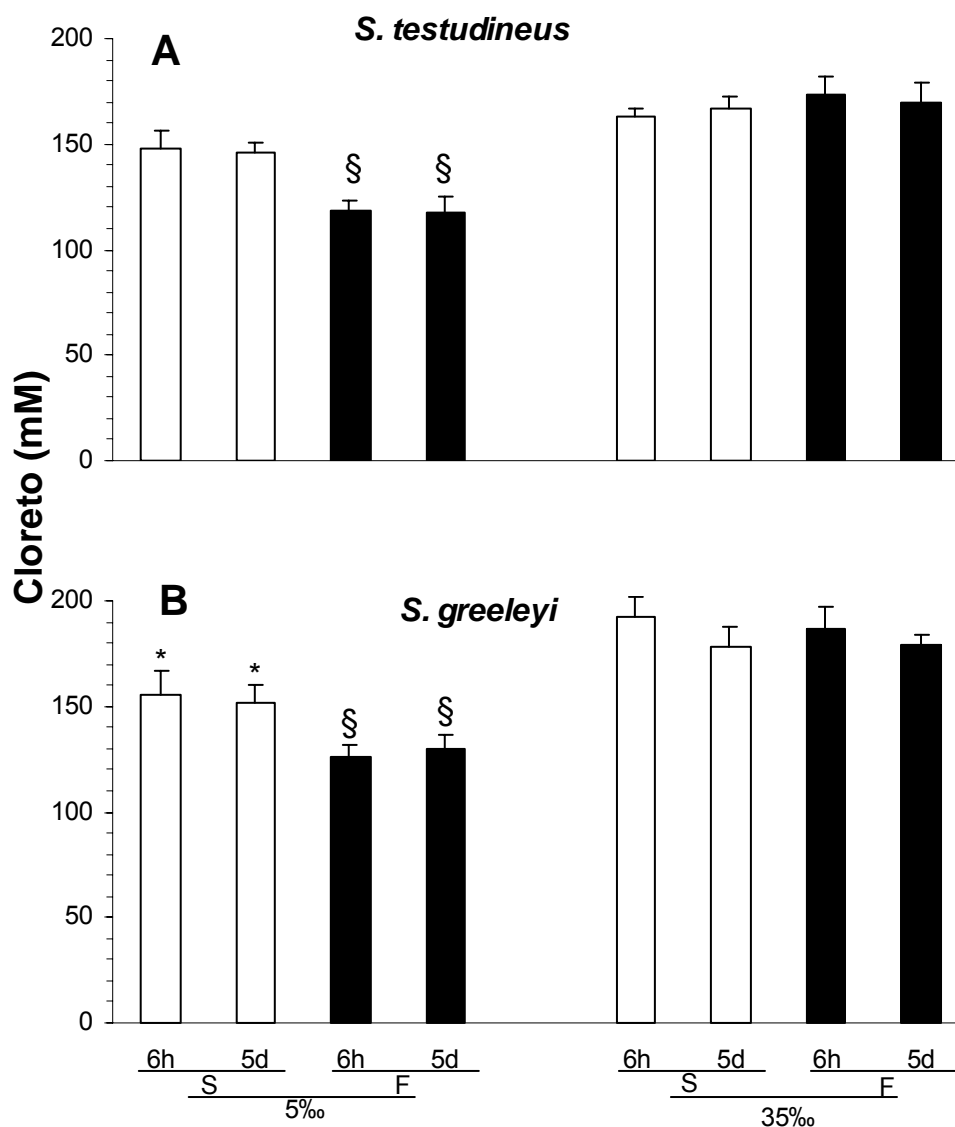


Figura 2. Cloreto do plasma (média \pm erro padrão, mM) de *S. testudineus* (A, n: 6-8) e *S. greeleyi* (B, n: 6-9) expostos por 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) às salinidades de 5‰ ou 35‰, e injetados com salina S, barras brancas) ou furosemida (F, barras pretas). § = efeito da injeção (injeção de furosemida \neq injeção de salina, mesma salinidade, mesma espécie, mesmo tempo); * = efeito da salinidade (5‰ \neq 35‰, mesma injeção, mesma espécie, mesmo tempo) sempre com $P < 0,05$.

Sódio

As concentrações plasmáticas de sódio de *S. testudineus* injetados com furosemida e mantidos em 35‰, após 5 dias ($191 \pm 14,1$ mM), foram maiores que seus respectivos controles injetados com salina e mantidos em 35‰ também por 5 dias ($150 \pm 2,7$ mM). O único efeito do tempo no sódio plasmático de *S. testudineus* foi verificado para os peixes injetados com salina e mantidos em 35‰, com valores de sódio plasmático após 5 dias menores que os de 6 horas (Fig. 3A). A injeção de furosemida levou ao aumento dos valores de sódio em *S. greeleyi* após 5 dias em 35‰ ($219 \pm 8,3$ mM), em relação aos $179 \pm 21,5$ mM dos peixes injetados com salina, como também observado para *S. testudineus* (Fig. 3B).

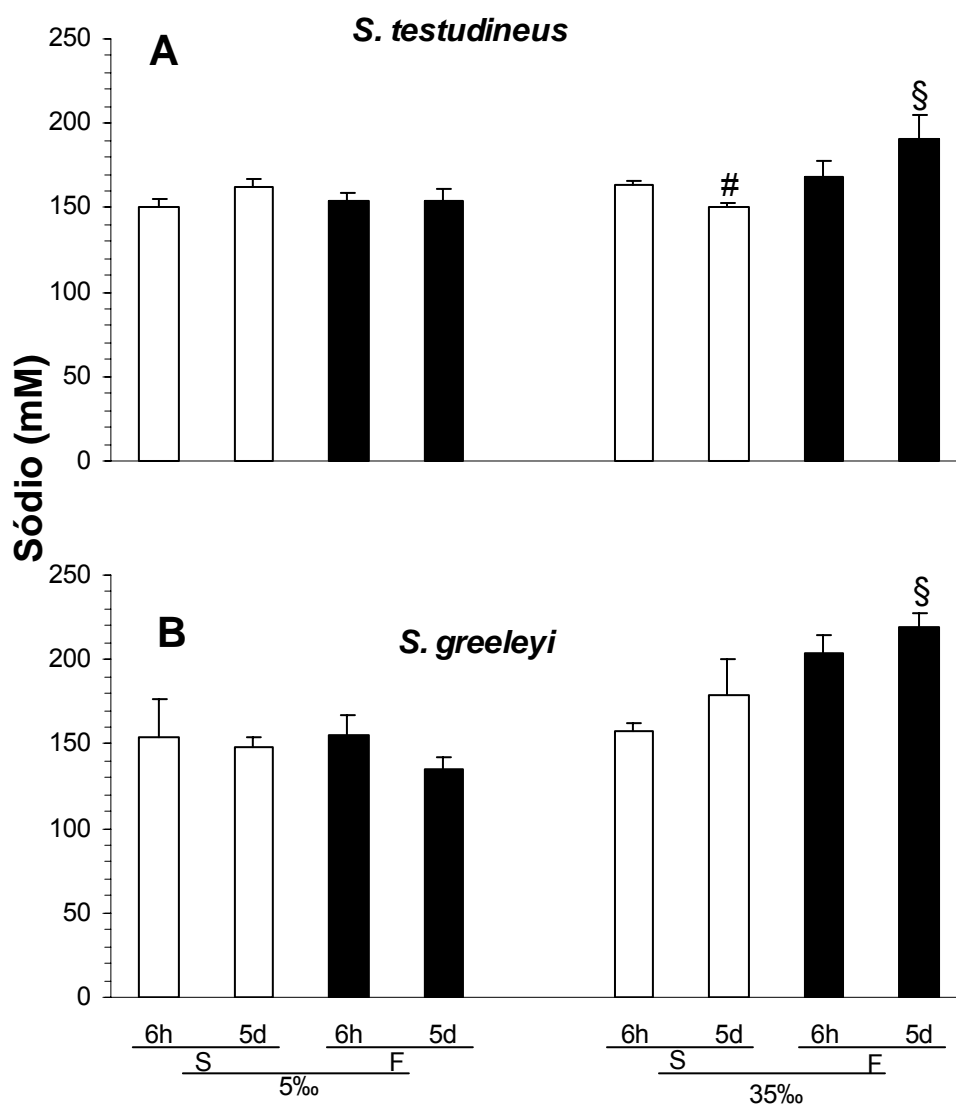


Figura 3. Sódio do plasma (média \pm erro padrão, mM) de *S. testudineus* (A, n: 5-6) *S. greeleyi* (B, n: 3-5) expostos por 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) às salinidades 5‰ ou 35‰, e injetados com salina (S, barras brancas) ou furosemida (F, barras pretas). Os símbolos indicam diferença significativa como na legenda da Figura 1.

Hematócrito

A injeção de furosemida levou à uma redução dos valores do hematócrito (Hct) em *S. testudineus* após 5 dias em ambas as salinidades 5‰ ($24,7 \pm 1,4\%$) e 35‰ ($18,7 \pm 1,8\%$), quando comparados a seus respectivos controles injetados com salina (5‰: $31,7 \pm 0,8\%$, 35‰: $31,0 \pm 0,8\%$) (Fig. 4A). Os valores do Hct em *S. testudineus* expostos por 5 dias foram diferentes dos valores após 6 horas de exposição em 35‰, em ambos os grupos: injetados com salina (6 horas: $25,2 \pm 2,0\%$, 5 dias: $31,0 \pm 0,8\%$) e injetados com furosemida (6 horas: $26,3 \pm 2,3\%$, 5 dias: $18,7 \pm 1,8\%$). Com um resultado distinto, o Hct de *S. greeleyi* não foi afetado pela injeção de furosemida ou pela exposição à salinidade após 6 horas ou 5 dias de exposição (Fig. 4B).

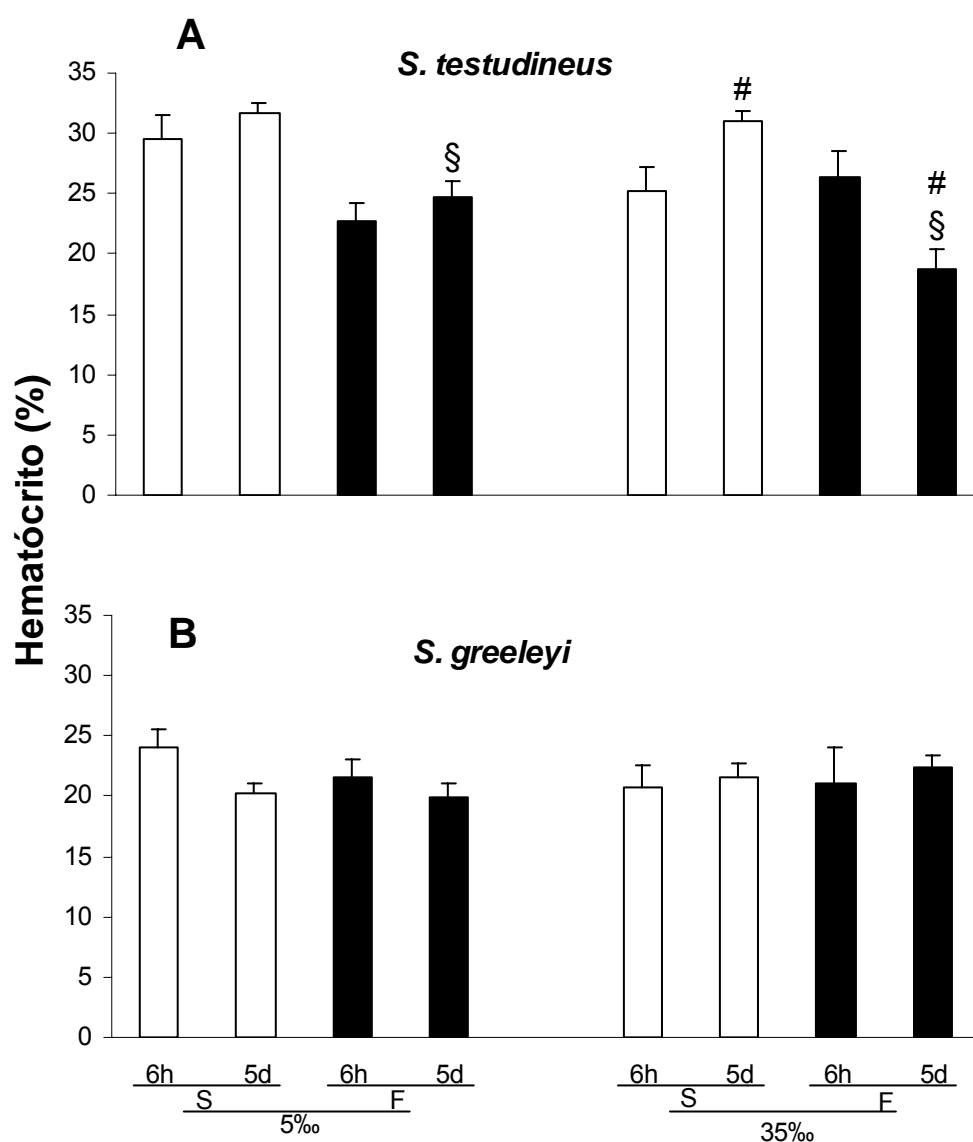


Figura 4. Hematócrito (média \pm erro padrão, %) de *S. testudineus* (A, n: 6-7) e *S. greeleyi* (B, n: 6-7) expostos por 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) às salinidades 5‰ ou 35‰, e injetados com salina (S, barras brancas) ou furosemida (F, barras pretas). Os símbolos indicam diferença significativa como na legenda da Figura 1.

Conteúdo de Água no Músculo

S. testudineus injetados com furosemida em 5‰ tiveram elevação no conteúdo de água no músculo (CAM) após 6 horas ($88,8 \pm 2,4\%$) e 5 dias ($80,6 \pm 1,0\%$) quando comparados a seus respectivos controles injetados com salina, após 6 horas ($80,5 \pm 2,1\%$) e 5 dias ($70,9 \pm 1,0\%$) (Fig. 5A). Após 5 dias em 35‰, a injeção de furosemida levou a redução do CAM ($56,6 \pm 4,5\%$) comparado ao seu respectivo controle injetado com salina ($72,7 \pm 0,9\%$) (Fig. 5A). Finalmente, ocorreu efeito do tempo de exposição sobre o CAM de *S. testudineus*. Após 5 dias os valores sempre foram menores do que após 6 horas (Fig. 5A). A injeção de furosemida em *S. greeleyi* reduziu o CAM após 5 dias, em 5‰, de $87,9 \pm 2,0\%$ nos animais injetados com salina para $80,5 \pm 2,6\%$ nos injetados com furosemida, e em 35‰, de $88,3 \pm 1,0\%$ nos injetados com salina para $83,1 \pm 1,3\%$ nos injetados com furosemida (Fig. 5B). O único efeito do tempo de exposição foi verificado para *S. greeleyi* injetado com salina em 5‰, onde o CAM após 5 dias ($87,9 \pm 2,0\%$) foi maior que o CAM após 6 horas ($82,3 \pm 1,5\%$).

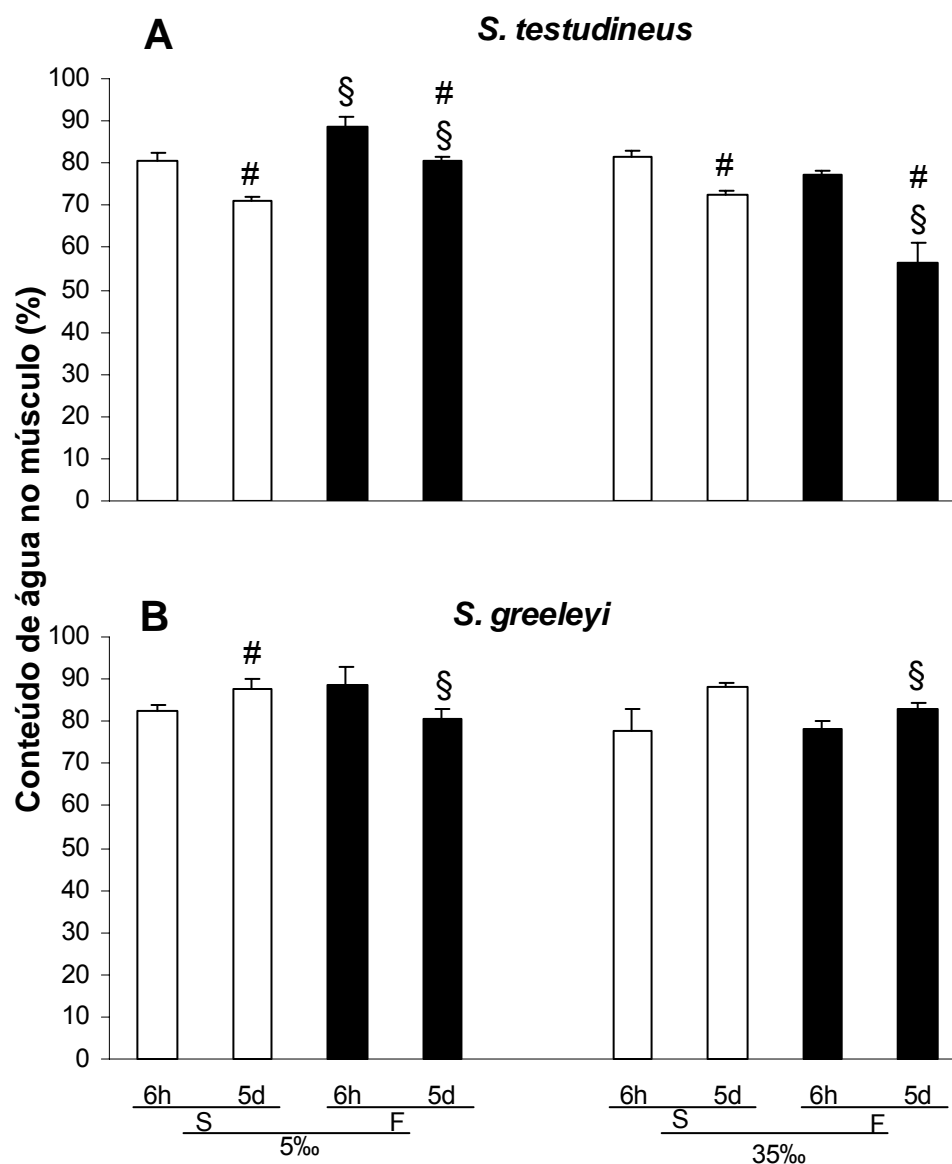


Figura 5. Conteúdo de água no músculo (média \pm erro padrão, %) de *S. testudineus* (A, n: 6-8 e *S. greeleyi* (B, n: 6-8) expostos por 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) às salinidades 5‰ ou 35‰, e injetados com salina (S, barras brancas) ou furosemida (F, barras pretas). Os símbolos indicam diferença significativa como na legenda da Figura 1.

Imunocitoquímica do NKCC

Todos os filamentos branquiais de *S. testudineus* e *S. greeleyi* expostos por 6 horas ou 5 dias a 35‰ e 5‰ e observados sob microscópio de fluorescência apresentaram sinal do co-transportador Na,K,2Cl (NKCC) em sua região interlamelar, onde localizam-se as células ricas em mitocôndrias, e onde foi produzido um sinal positivo para o anticorpo $\alpha 5$ anti-Na,K-ATPase (Iowa DSHB) (ver resultados do Capítulo 2) (Fig. 6). As brânquias dos peixes analisadas em cada grupo experimental foram sistematicamente examinadas, e não houve evidência de drástica alteração no sinal do NKCC (Fig. 6).

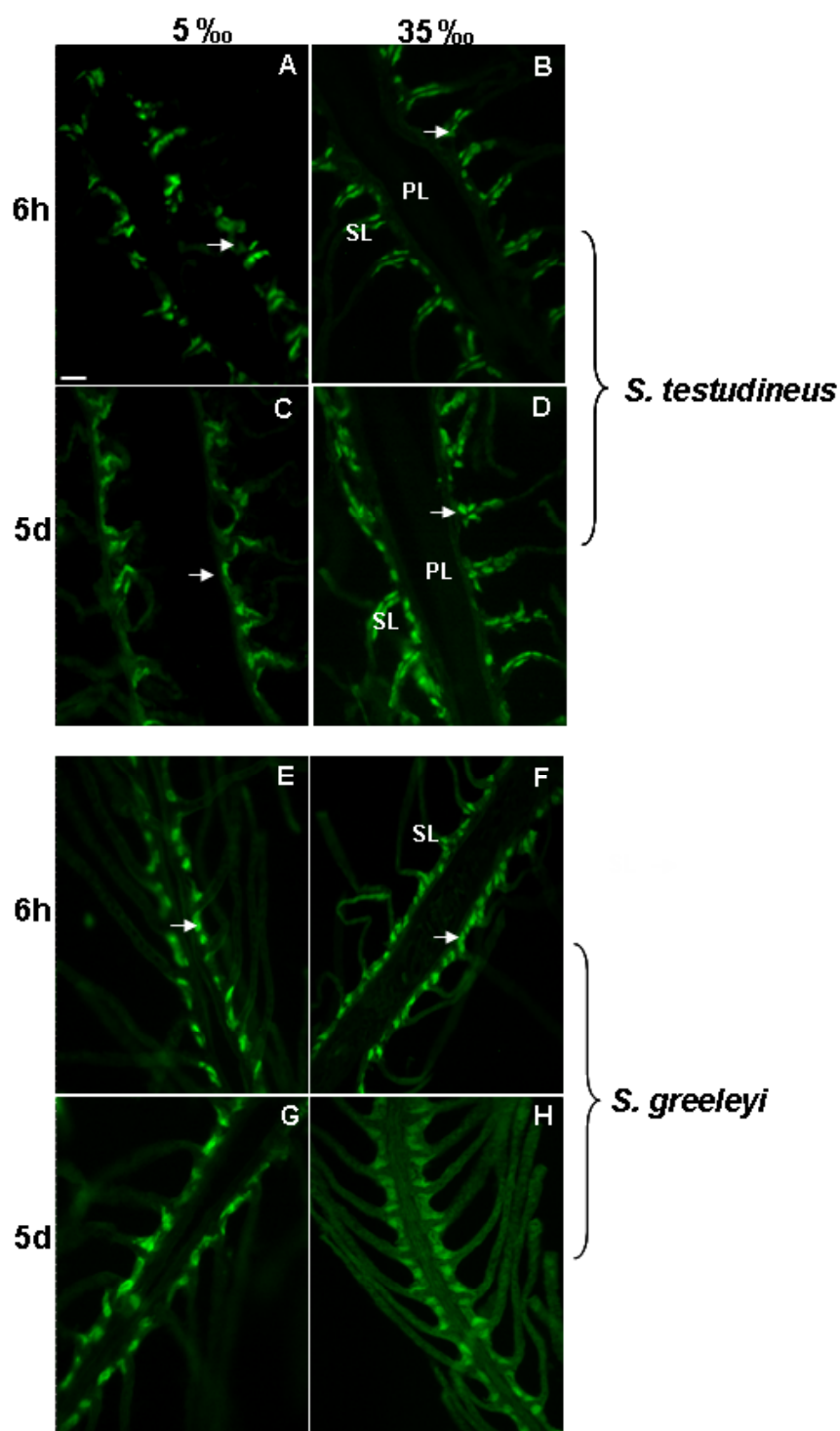


Figura 6. Imunofluorescência do NKCC no epitélio branquial de *S. testudineus*: A 5‰, 6 horas (6h); B 35‰, 6h; C 5‰, 5 dias (5d); D 35‰, 5d, e de *S. greeleyi*: E 5‰, 6h; F 35‰, 6h; G 5‰, 5d; H 35‰, 5d. As setas brancas indicam o sinal do NKCC nas células de cloreto ao longo da região interlamelar na lamela primária (PL), entre a lamela secundária (SL). Barra de escala (A-H): 50 μ m

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Ambas as espécies confirmaram as observações prévias de elevada capacidade de osmorregulação de seu fluido extracelular: osmolalidade e sódio plasmáticos não foram reduzidos nos exemplares de ambas as espécies injetados com salina após exposição à água do mar diluída (Figs. 1 e 3), sendo que o cloreto plasmático foi significativamente reduzido apenas em *S. greeleyi* (Fig. 2). Além disso, a injeção de salina não afetou os peixes, com os resultados aqui obtidos repetindo observações prévias para ambas as espécies não injetados em laboratório (Prodocimo & Freire, 2001) e no ambiente natural (Prodocimo & Freire, 2004).

O procedimento experimental da injeção de furosemida nos peixes *in vivo* foi relatado pela primeira vez neste estudo. Os resultados obtidos foram consistentes com a inibição do NKCC em água do mar. Em 35‰, a injeção de furosemida levou ao aumento da osmolalidade do plasma, indicando a redução na secreção de sal, através da ação inibidora da furosemida no NKCC (NKCC1) basolateral nas células de cloreto branquiais (p. ex. Wilson et al, 2000; Pelis et al., 2001; Marshall, 2003). Curiosamente, o cloreto plasmático não aumentou com a injeção de furosemida em 35‰ (Fig. 2), não acompanhando os valores da osmolalidade (Fig. 1), enquanto o sódio plasmático elevou-se (Fig. 3). Esta discrepância entre os efeitos da furosemida sobre o sódio e o cloreto pode ser explicado. Com o NKCC1 basolateral inibido pela furosemida, menos K^+ entraria na célula de cloreto através do NKCC, assim existiria a redução no potencial eletroquímico intracelular do K^+ , conseqüente redução na força motriz para saída de K^+ através dos canais basolaterais de K^+ . Este decréscimo na saída do K^+

poderia resultar em uma diminuição da voltagem transepitelial (serosa positiva), assim diminuindo a força eletro-motriz para a secreção de Na^+ através da via paracelular, entre as células de cloreto e as células acessórias. Por outro lado, o cloreto poderia ter sua secreção inalterada pela furosemida devido a um aumento compensatório da entrada de cloreto nas células de cloreto através do trocador de ânion basolateral (Marshall & Bryson, 1998), como um resultado direto de um gradiente químico favorável (embora não elétrico) para cloreto através da membrana basolateral das células de cloreto criado pela inibição do NKCC (Halm et al., 1985). É importante adicionar que o Na^+ pode não entrar nas células de cloreto com o NKCC inibido, mas continua sendo bombeado para fora através da Na^+, K^+ -ATPase. Este aumento pontual na concentração de Na^+ no lado seroso do epitélio não poderia significar aumento significativo na força eletro-motriz para o efluxo de Na^+ , porque o componente químico do gradiente eletroquímico com a água do mar é ainda desfavorável para a saída de Na^+ . A diminuição do componente elétrico discutido acima poderia ser responsável pela redução na saída de Na^+ , resultando em elevação da osmolalidade do plasma. Outro ânion, ou mais que um ânion, poderiam ter aumentando para preservar a eletro-neutralidade do plasma, mas nós não sabemos sua identidade, podendo ser bicarbonato, sulfato, fosfato, ou um ânion orgânico.

Quando a furosemida foi injetada nos peixes mantidos em água do mar diluída (5‰), ambas as espécies apresentaram redução nos níveis de cloreto plasmático, mas não nos níveis de sódio, e osmolalidade foi reduzida apenas em *S. greeleyi*, quando comparada aos estáveis controles injetados com salina (Figs. 1, 2, e 3). A primeira hipótese para explicar este resultado seria que o NKCC poderia estar envolvido na absorção de sal na água do mar diluída. No entanto,

não há suporte para esta inversão na direção do transporte de sal quando peixes marinhos/estuarinos estão hipo-regulando em água do mar diluída (Marshall, 2003; McCormick et al., 2003; Wood & Laurent, 2003). As evidências levam a uma redução na secreção de sal branquial, entre outras alterações (Marshall et al., 2002a; Marshall, 2003; McCormick et al., 2003; Scott et al., 2004). A tendência geral para a diluição do plasma após a injeção de furosemida em 5‰ pode conduzir a uma questão: O que o NKCC faz para auxiliar o peixe a se livrar da entrada de água osmótica em excesso ou para conservar sal em água do mar diluída? Nós podemos tentar responder raciocinando sobre as alterações que ocorrem seguindo-se à exposição de peixes marinhos à água do mar diluída. Após choque hipotônico, os 3 órgãos (brânquias, intestino e rim) que expressam o NKCC e são responsáveis pela osmorregulação dos peixes, sofrem alterações significativas. Nas brânquias ocorre um influxo osmótico de água, e dramática redução na secreção de sal. Esta resposta rápida para a redução na secreção de sal é devido ao inchamento das células de cloreto, com o conseqüente reflexo de norepinefrina e sua ação através de receptores α 2-adrenérgicos, resultando em defosforilação inibitória do NKCC (Marshall, 2003), e inibição do CFTR pela fosforilação por tirosina quinase (Marshall et al., 2000). Aliado a estas ações regulatórias intracelulares nos transportadores de cloreto, existe um notável controle morfológico através do fechamento dos anéis de actina localizados nas criptas apicais, levando as células de cloreto à perda do contato com o meio externo (Daborn et al., 2001). Após um tempo maior (1-2 dias) em água do mar diluída, existe uma provável redistribuição do NKCC e do CFTR de suas localizações na membrana ideais para secreção de sal, para uma localização mais difusiva no citoplasma. Pelo menos este fenômeno foi observado em peixes

estuarinos aclimatados a água doce (Marshall & Singer, 2002; Marshall et al., 2002a; McCormick et al., 2003). Alterações extra-branquiais envolvem imediata redução na ingestão de água durante exposição a água do mar diluída (Potts & Evans, 1967; revisado em Wood & Laurent, 2003), com concomitante redução na absorção de sal e água pelo epitélio intestinal, o qual também expressa NKCC basolateralmente e apicalmente (O'Grady et al., 1987; Marshall et al., 2002b). Finalmente, a exposição a água do mar diluída leva a um aumento na taxa de filtração, acompanhado da elevação na excreção de água (Fleming & Stanley, 1965; revisado em Wood & Laurent, 2003). NKCC foi demonstrado em rim de teleósteo (Cutler & Cramb, 2002), e foi localizado na membrana apical do rim de elasmobrânquios (Biemesderfer et al., 1996), trabalhando na reabsorção de sal (revisado em Dantzler, 2003).

De acordo com este cenário, nós podemos especular que a furosemida causa redução na osmolalidade e cloreto do plasma nos baiacus expostos a água do mar diluída através de sua ação no NKCC renal. Nós estamos conscientes de que esta hipótese deve ser considerada cautelosamente, já que a osmolalidade do plasma de *S. testudineus* não foi reduzida (Fig. 1). Novamente, a resposta diferente apresentada pelo cloreto e sódio plasmático não é totalmente inesperada, tendo em vista a discussão prévia do efeito da furosemida em água do mar. Furosemida é uma molécula pequena. Ela é filtrada e chega ao lúmen tubular onde pode inibir a absorção transepitelial de NaCl mediado pelo NKCC apical (Cutler & Cramb, 2002). Esta inibição levaria ao aumento da perda renal de sal na urina, causando diluição do fluido extracelular, e/ou depleção de volume. Tentando especular adicionalmente, o NKCC presente nas células mesangiais no glomérulo (Hickman & Trump, 1969; Youson & Butler, 1988; Hentschel & Elger,

1989) poderia ser necessário para aumentar o ritmo de filtração glomerular devido à necessidade de elevar a excreção de água em água do mar diluída. NKCC foi mostrado nas células mesangiais extraglomerulares e nas células da mácula densa, desempenhando papel na retroalimentação tubuloglomerular em rim de mamíferos (revisado em Mount et al., 1998). Furosemida, inibindo o NKCC das células mesangiais, poderia interromper o aumento no ritmo de filtração glomerular, levando a retenção de água e diluição do fluido extracelular nos peixes injetados com furosemida, contribuindo assim para o efeito na reabsorção tubular de sal. De qualquer forma, a elucidação do papel do NKCC renal na osmorregulação dos peixes é um assunto interessante para estudos futuros. O efeito significativo no NKCC intestinal seria tão esperado devido a provável redução drástica na ingestão de água. Finalmente, o NKCC branquial estaria inibido, como descrito acima, mas mesmo se o NKCC branquial ainda estivesse disponível e funcional na membrana basolateral em 5‰, sua inibição não poderia contribuir para a diluição do plasma.

O NKCC aparentemente atua na regulação de volume celular dos baiaicus, evidenciado pelo efeito da furosemida no hematócrito e no conteúdo de água no músculo em 35‰, com maior intensidade em *S. testudineus*. O efeito da furosemida pode ser indireto, levando a redução no conteúdo de água no músculo e no hematócrito porque a osmolalidade do plasma aumentou em consequência da ação da furosemida no NKCC branquial em água do mar. No entanto, parece haver um efeito direto sobre o NKCC da membrana celular, o qual atua no aumento regulatório de volume (*regulatory volume increase* - RVI) (Russell, 2000). Se o NKCC não atuasse no RVI, as células musculares não perderiam água nos peixes em 35‰ injetados com furosemida. A furosemida afeta o conteúdo de

água nas células musculares levando a perda de água das células em 35‰ e ganho de água em 5‰ em *S. testudineus*. O ganho de água nas células em 5‰ após injeção de furosemida é um indicativo da ação do NKCC na redução regulatória de volume (*regulatory volume decrease* - RVD), como observado em neurônios de *Aplysia brasiliiana* (Scemes & Cassola, 1995). Alternativamente, a furosemida pode inibir o co-transporte K-Cl (KCC), que normalmente atua no RVD necessário quando há diluição do plasma (Mount et al., 1998; Russell, 2000).

Furosemida, bem como bumetanida, são inibidores fracos do KCC (Mount et al., 1998; Russell, 2000), indicando que o NKCC provavelmente tem papel principal na regulação de volume celular nos baiacus (Russell, 2000), mais evidente em *S. testudineus* que em *S. greeleyi*. Estudos adicionais de regulação de volume celular devem ser realizados para confirmar tal especulação. É importante observar que os exemplares de *S. greeleyi* são menores que os exemplares de *S. testudineus*, conseqüentemente a dose efetiva de furosemida injetada foi maior em *S. greeleyi*. Apesar disso, a injeção de furosemida causou efeitos mais freqüentes e evidentes no hematócrito e na água do músculo em *S. testudineus*, evidenciando a idéia de que há uma maior presença/expressão de NKCC nos seus tecidos que em *S. greeleyi*. Ambas as espécies apresentaram capacidade de regulação do volume de água celular, e a salinidade não apresentou efeito visível no hematócrito (Fig. 4) e no conteúdo de água no músculo (Fig. 5) dos animais injetados com salina. Os valores de hematócrito obtidos para *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram similares aos valores prévios reportados para teleósteos: ~25-30 % (Plaut, 1998; Claireaux & Audet, 2000; Brown et al., 2001; Martinez-Álvarez et al., 2002).

A imunofluorescência realizada utilizando o anticorpo T4 detectou NKCC na região interlamelar das brânquias de ambas as espécies, em ambas as salinidades e tempos. A distribuição e o sinal do NKCC no epitélio branquial de ambas as espécies é coerente com os resultados da injeção de furosemida *in vivo* em 35‰, elevando a osmolalidade e o sódio do plasma como efeito da inibição do NKCC branquial. O anticorpo T4 reconheceu uma banda proteica que se apresentou arrastada mas, compatível em peso molecular como reportado para o NKCC do salmão *Salmo salar* (~285 kDa, Pelis & McCormick, 2001; Pelis et al., 2001) (Western blots, dados não mostrados). As bandas de baixo peso molecular reconhecidas pelo anticorpo T4 observadas a 120 kDa (salmão, Pelis & McCormick, 2001; Pelis et al., 2001) e a 160-170 kDa (salmão, Pelis & McCormick, 2001; Pelis et al., 2001, e killifish, Scott et al., 2004) não apareceram nos Western blots das brânquias de *S. testudineus* e *S. greeleyi* (dados não mostrados).

Apesar da complexidade da interpretação do ensaio com injeção *in vivo*, ficou claro que o alvo principal da furosemida em 35‰ foi o NKCC branquial, órgão principal envolvido na hipo-regulação do plasma em água do mar. A ausência de alterações drásticas na presença do NKCC nas células de cloreto branquiais em água do mar diluída está de acordo com a literatura (Marshall et al., 2002a, Marshall, 2003; McCormick et al., 2003, Scott et al., 2004). A resposta rápida (até ~12 horas) à redução de salinidade, é razoável supor, não envolveria um efeito significativo na degradação de proteínas e *turnover* ou síntese *de novo*, porque seria muito dispendioso para a célula. Alterações na expressão de proteínas deve ocorrer após exposição de longo prazo (i.e., 1- 30 dias, Scott et al., 2004) à alterações de salinidade. Adicionalmente à redução na expressão,

pode haver redistribuição do NKCC no compartimento sub-celular, mas as análises das imagens realizadas neste trabalho não permitiram inferir tal redistribuição. Em conclusão, a diferença na tolerância à diluição da água do mar por ambas as espécies de baiacus pode parcialmente ser explicada pela forte sugestão de participação do NKCC na regulação do conteúdo de água celular em *S. testudineus*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biemesderfer, D., Payne, J.A., Lytle, C.Y., Forbush III, B., 1996. Immunocytochemical studies of the Na-K-Cl cotransporter of shark kidney. *Am. J. Physiol.* 270, F927 – F936.
- Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. *J. Fish Biol.* 59, 1544 – 1555.
- Claireaux, G., Audet, C., 2000. Seasonal changes in the hypo-osmoregulatory ability of brook charr: the role of environmental factors. *J. Fish Biol.* 56, 347 - 373.
- Cutler, P.C., Cramb, G., 2002. Two isoforms of the $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochim. Biophys. Acta* 1566, 92 – 103.
- Daborn, K., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S., 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 204, 1889 – 1899.

- Dantzler, W.H., 2003. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. *Comp. Biochem. Physiol.* 136A, 453 – 478.
- Evans, D.H., 1993. *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI Teleostei (5). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fleming, W.R., Stanley, J.G., 1965. Effects of rapid changes in salinity on the renal function of a euryhaline teleost. *Am. J. Physiol.* 209, 1025 – 1030.
- Forbush III, B., Haas, M., Lytle, C., 1992. Na-K-Cl cotransport in the shark rectal gland. I. Regulation in the intact perfused gland. *Am. J. Physiol.* 262, C1000 – C1008.
- Halm, D.R., Krasny Jr, E.J., Frizzell, R.A., 1985. Electrophysiology of flounder intestinal mucosa. II. Relation of the electrical potential profile to coupled NaCl absorption. *J. Gen. Physiol.* 85, 865 – 883.
- Hentschel, H., Elger, M., 1989. Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. In: Kinne, R.K.H. (Ed), *Structure and Function of the Kidney*, vol. 1. *Comparative Physiology*. Karger, Basel, pp. 1 - 72.
- Hickman, C.P. Jr, Trump, B.F., 1969. The kidney. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 91 - 239.
- Jobling, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London.
- Lytle, C., Forbush III, B., 1992a. Na-K-Cl cotransport in the rectal gland. II. Regulation in isolated tubules. *Am. J. Physiol.* 262, C1009 - C1017.

- Lytle, C., Forbush III, B., 1992b. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 267, 25438 - 25443.
- Lytle, C., Xu, J.C., Biemesderfer, D., Forbush III, B., 1995. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 269, C1496-C1505, 1995.
- Marshall, W.S., 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 95 – 105.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., 1998. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 97 – 106.
- Marshall, W.S., Singer, T.D., 2002. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in teleost fish. *Biochim. Biophys. Acta* 1566, 16 – 27.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Luby, T., 2000. Control of epithelial Cl⁻ secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 203, 1897 – 1905.
- Marshall, W.S., Lynch, E.M., Cozzi, R.R.F., 2002a. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. *J. Exp. Biol.* 205, 1265 – 1273.
- Marshall, W.S., Ossum, C.G., Hoffmann, E.K., 2005. Hypotonic shock mediation by p38 MAPK, JNK, PKC, FAK, OSR1 and SPAK in osmosensing chloride secreting cells of killifish opercular epithelium. *J. Exp. Biol.* 208, 1063 – 1077.

- Marshall, W.S., Howard, J.A., Cozzi, R.R.F., Lynch, E.M., 2002b. NaCl and fluid secretion by intestine of teleost *Fundulus heteroclitus*: involvement of CFTR. J. Exp. Biol. 205, 745 – 758.
- Martínez-Álvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. J. Exp. Biol. 205, 3699 – 3706.
- McCormick, S.D., Sundell, K., Björnsson, B.T., Brown, C.L., Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). J. Exp. Biol. 206, 4575 – 4583.
- Mount, D.B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A.E., Poch, E., Hoover Jr, R.S., Hebert, S.C., 1998. The electroneutral cation-chloride cotransporters. J. Exp. Biol. 201, 2091 – 2102.
- Nardi, M., 1999. Assembléia de peixes em um ambiente de gamboa. Pontal do Sul, 1999. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.
- O'Grady, S.M., Palfrey, H.C., Field, M., 1987. Na-K-2Cl cotransport in winter flounder intestine and bovine kidney outer medulla: [³H] bumetanide binding and effects of furosemide analogues. J. Membr. Biol. 96, 11 - 18.
- Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of atlantic salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 124, 134 – 143.
- Pelis, R.M., Zydlewski, J., McCormick, S.D., 2001. Gill Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter abundance and location in atlantic salmon: effects of seawater and smolting. Am. J. Physiol. 280, R1844 - R1852.

- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 59, 325 - 347.
- Philpott, C.W., 1980. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. *Am. J. Physiol.* 238, R171 - R184.
- Plaut, I., 1998. Comparison of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 181 – 188.
- Potts, W.T.W., Evans, D.H., 1967. Sodium and chloride balance in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.* 133, 411 - 425.
- Prodócimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262, 243 - 253.
- Prodócimo, V., Freire, C.A., 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 37, 1 - 5.
- Russell, M.J., 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.* 80, 211 - 276.
- Scemes, E., Cassola, A.C., 1995. Regulatory volume decrease in neurons of *Aplysia brasiliensis*. *J. Exp. Zool.* 272, 329 – 337.
- Scott, G.R., Richards, J.G., Forbush, B., Isenring, P., Schulte, P.M., 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *Am. J. Physiol.* 287, C300 – C309.
- Vendel, A.L., Spach, H.L., Lopes, S.G., Santos, C., 2002. Structure and dynamics of fish assemblages in a tidal creek environment. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 365 – 373.
- Wilson, J.M., Randall, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Ip, A.K.Y., 2000. Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *J. Exp. Biol.* 203, 2297 - 2310.
- Wood, C.M., Laurent, P., 2003. Na⁺ versus Cl⁻ transport in the intact killifish after rapid salinity transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 106 – 119.
- Youson, J.H., Butler, D.G., 1988. Morphology of the kidney of adult bowfin, *Amia calva*, with emphasis on renal chloride cells in the tubule. *J. Morph.* 196, 137-156.

**CAPÍTULO 2: A Na^+, K^+ -ATPase E ATPase TOTAL DOS BAIACUS
ESTUARINOS (*Sphoeroides testudineus* E *Sphoeroides greeleyi*) NA
TRANSIÇÃO ENTRE HIPO- E HIPER-REGULAÇÃO DA OSMOLALIDADE DO
PLASMA**

SUMÁRIO

RESUMO	48
ABSTRACT	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3 RESULTADOS	58
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	66
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMO

Os baiacus *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* são espécies estuarinas com eficiente capacidade osmorregulatória. Contudo, *S. testudineus* tolera maior diluição da água do mar quando comparado a *S. greeleyi*. Este estudo teve como objetivo avaliar se a exposição à água do mar diluída e água com salinidade 35‰ alteram o sinal imunocitoquímico da presença da Na^+, K^+ -ATPase nas brânquias destes baiacus, além das reservas metabólicas (lipídicas) e a atividade ATPásica total nos órgãos osmorregulatórios (brânquias e rins). Após exposição dos peixes às salinidades 35‰ e 5‰ por 6 horas e 5 dias, avaliou-se a presença da Na^+, K^+ -ATPase branquial, o conteúdo de triglicerídios e atividade ATPásica das brânquias e rins, a osmolalidade (Osm) e cloreto (Cl^-) plasmáticos, o hematócrito (Hct) e o conteúdo de água no músculo (CAM). A Na^+, K^+ -ATPase foi localizada na região interlamelar do epitélio branquial de ambas as espécies em ambas as salinidades, em intensidade constante. A atividade ATPásica total apresentou redução na salinidade 5‰ comparada a 35‰ apenas para o rim de *S. greeleyi*, e foi maior na brânquia de *S. greeleyi* do que em *S. testudineus* após 6 horas. A concentração de triglicerídeos totais foi maior em *S. greeleyi* do que em *S. testudineus* em todas as condições experimentais, nas brânquias e rins. A Osm foi reduzida em ambas as espécies e o Cl^- em *S. greeleyi* após 6 horas e 5 dias na salinidade 5‰, quando comparado a 35‰. O Hct de *S. greeleyi* aumentou após 5 dias em 5‰, e o CAM não foi alterado em ambas as espécies, sendo sempre de aproximadamente 80%, em todas as condições. Apesar de apresentarem diferença na tolerância a redução da salinidade, ambas as espécies apresentaram mecanismos de regulação osmótica semelhantes, e mesmo padrão de resposta às salinidades 5‰ (durante a hiper-regulação) e 35‰ (durante a hipo-regulação). Os resultados mostraram tendência de redução nas concentrações plasmáticas em 5‰, porém com estabilidade no Hct e CAM, indicando controle do conteúdo de água das células, a despeito da ligeira diluição do plasma. A maior tolerância de *S. testudineus* à água do mar diluída não foi portanto explicada claramente pela Na^+, K^+ -ATPase. Contudo, pode ser parcialmente explicada por diferenças metabólicas dos órgãos osmorregulatórios entre as duas espécies.

ABSTRACT

The pufferfishes *Sphoeroides testudineus* and *Sphoeroides greeleyi* are estuarine species and efficient osmoregulators. However, *S. testudineus* tolerates seawater dilution much better than *S. greeleyi*. This study aimed at evaluating whether this differential tolerance can be explained by the Na^+, K^+ -ATPase. It was here tested whether exposure to dilute seawater modifies the immunocytochemical signal of the branchial Na^+, K^+ -ATPase, besides the metabolic reserves of lipids, and the total ATPase activity in their osmoregulatory organs (gills and kidneys). The fishes were exposed to seawater of salinity 35‰ and diluted seawater of salinity 5‰, for 6 hours and 5 days. The following parameters have been evaluated: the presence of branchial Na^+, K^+ -ATPase, the triglyceride content and total ATPase activity in gills and kidneys, plasma osmolality (Osm) and chloride (Cl^-), hematocrit (Hct), and water content in muscle (WCM). The Na^+, K^+ -ATPase has been positively localized to the interlamellar region of the branchial epithelium in both species and in both salinities, under unaltered intensity. Total ATPase activity was reduced in 5‰ when compared to 35‰ only for the kidney of *S. greeleyi*. The activity was higher in the gills of *S. greeleyi* than in those of *S. testudineus*, after 6 hours in both salinities. Total triglyceride content was higher in *S. greeleyi* than in *S. testudineus* in all experimental conditions, in both organs. Upon exposure to dilute seawater, Osm was reduced in both species, and Cl^- was reduced in *S. greeleyi*. The Hct of *S. greeleyi* has increased after 5 days in 5‰, but the WCM was not modified in both species, being always of approximately 80%. Both species thus displayed a similar osmoregulatory pattern when exposed to dilute seawater. There was a trend of reduction in plasma concentrations, but stability in Hct and CAM, indicating water content control by the cells, despite a slight plasma dilution. The higher tolerance of *S. testudineus* to dilute estuarine waters was thus not clearly explained by the Na^+, K^+ -ATPase. However, it can be at least partially explained by metabolic differences in the osmoregulatory organs.

1 INTRODUÇÃO

Os teleósteos marinhos são hipo-osmóticos à água do mar, e órgãos osmorregulatórios como o rim e as brânquias atuam na manutenção da homeostase do plasma secretando o excesso de sais ingeridos e absorvidos pelo trato digestivo (hipo-regulação) (Evans, 1993; Jobling, 1995). As células de cloreto do epitélio branquial são as principais responsáveis pela secreção e absorção de sal (NaCl). Estas células caracterizam-se por apresentar mitocôndrias envoltas por um sistema tubular de membranas rico em proteínas transportadoras de íons (Philpott, 1980; Jobling, 1995; Perry et al., 1996; Perry, 1997). O rim dos teleósteos marinhos é responsável pela secreção íons multivalentes (Mg^{+2} e SO_4^{2-}) e substâncias orgânicas, muitas vezes através da exocitose de vesículas (Beyenbach & Baustian, 1989; Beyenbach et al., 1993; Hentschel & Zierold, 1994; Freire et al., 1996), e reabsorção do cloreto de sódio (Hentschel & Elger, 1989; Hentschel et al., 1993; Beyenbach, 1995).

Dentre os transportadores que atuam na regulação osmo-iônica dos teleósteos destacam-se as ATPases, grupo de enzimas que utilizam ATP como substrato energético e são responsáveis pelo transporte de íons fundamentais para o organismo dos animais (Stahl & Baskin, 1990). Por utilizarem ATP e com isso gastarem energia, a determinação da atividade ATPásica total pode representar parcialmente o estado metabólico dos animais quando estes são submetidos a estresse osmótico. O teleósteo marinho eurihalino *Dicentrarchus labrax* submetido à redução de salinidade até chegar a água doce em um período total de 7 dias teve sua atividade ATPásica total nas brânquias e no rim reduzidas (Venturini et al., 1992).

Dentro do grupo das ATPases destaca-se a enzima Na^+, K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral das células branquiais, e que atua na regulação osmótica e iônica do plasma tanto na secreção de sal na hiporegulação em água do mar, quanto na absorção de sal na hiper-regulação em água do mar muito diluída ou em água doce (Evans, 1993; Jobling, 1995). Anticorpos monoclonais específicos contra a sub-unidade α da Na^+, K^+ -ATPase localizaram esta enzima na base da lamela secundária e em células localizadas entre a lamela primária e secundária (células lamelares e pavimentosas) e nas membranas basolaterais de células de cloreto associadas ao sistema tubular, em diversos teleósteos: *Chanos chanos*, *Fundulus heteroclitus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis mossambicus*, *Stenogobius hawaiiensis* e *Tetraodon nigroviridis* (Witters et al., 1996; Goss et al., 1998; Marshall & Bryson, 1998; Randall & Brauner, 1998; Choe et al., 1999; Wilson et al., 2000a,b; Pelis et al., 2001; Pelis & McCormick, 2001; Katoh et al., 2003; Lin et al., 2003; McCormick et al., 2003; Lin et al., 2004).

O papel da Na^+, K^+ -ATPase da membrana basolateral na secreção de sal nas células branquiais de teleósteos é fundamental. Envolve a remoção de sódio das células de cloreto produzindo e sustentando um gradiente entre o meio intra- e extra-celular, favorecendo a entrada passiva de sódio na célula (Philpott, 1980; Jobling, 1995; McCormick, 1995). Além da Na^+, K^+ -ATPase, outras ATPases como a H^+ -ATPase, Ca^{+2} -ATPase e Mg^{+2} -ATPase estão presentes nos epitélios de transporte dos teleósteos e atuam em conjunto para a manutenção da homeostase, sendo em grande parte responsáveis pelo metabolismo branquial e dos órgãos osmorregulatórios (Doneen, 1993; Flik et al., 1993; Bijvelds et al., 1995; Sullivan et al., 1995; Perry, 1997; Goss et al., 1998; Marshall & Bryson,

1998; Randall & Brauner, 1998; Van Der Heijden et al., 1999; Wilson et al., 2000b; Marshall, 2002).

O baiacu *Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758 habita baías e estuários da costa brasileira em locais com salinidade variando de 0 ‰ a 34 ‰ (Figueiredo & Menezes, 2000). *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900 é comum no litoral brasileiro, também habita baías e estuários de águas pouco profundas, mas é restrito a áreas de salinidade elevada (~30‰) (Figueiredo & Menezes, 2000; Vendel et al., 2002). Ambas as espécies são eurihalinas, apresentando capacidade semelhante de regular a osmolalidade e os íons plasmáticos em água do mar (Prodocimo & Freire, 2001; 2004).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da redução de salinidade sobre a presença da $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ no epitélio branquial de *S. testudineus* e *S. greeleyi*. A hipótese testada neste estudo incluiu alterações na presença da $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ da membrana basolateral do epitélio branquial dos baiacus diante da necessidade de secretar e absorver quando os animais estuarinos são submetidos à redução de salinidade durante o ciclo de maré. A concentração de triglicerídeos na brânquia e no rim foi quantificada para avaliação da relação entre as reservas metabólicas (lipídicas) e o metabolismo tecidual (atividade ATPásica total) diante à redução e elevação de salinidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Exemplares adultos de *S. testudineus* (15 ± 1 cm de comprimento, 40 ± 1 g de peso) e de *S. greeleyi* (10 ± 1 cm, 20 ± 1 g) foram coletados na Gamboa do Rio Baguaçu ($25^{\circ} 33' 6,33''\text{S}$, $48^{\circ} 23' 41,63''\text{W}$), na margem sul da Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. As coletas foram realizadas durante a maré enchente com a instalação de uma rede de espera tipo fyke.

No momento da coleta a salinidade da água foi verificada com salinômetro (refratômetro Shibuya S-28, Japão). Os animais foram colocados em galão plástico, com aeração constante e transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná em Curitiba, Paraná. Os animais foram imediatamente colocados em aquário estoque com capacidade de 250 litros abastecido com água do mar do local de coleta com salinidade ajustada para 30‰, temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e constante aeração. Os peixes foram alimentados diariamente com crustáceos e oligoquetas durante todo o período de manutenção no laboratório e também durante os experimentos de exposição por 5 dias.

Experimentos

Após 7 dias de aclimação às condições laboratoriais, os espécimes de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram expostos por 6 horas e por 5 dias às salinidades de 5‰ e de 35‰ em aquários com capacidade de 30 litros, com aeração constante e temperatura de aproximadamente 20°C , e um número máximo de 3 animais por aquário. A água do mar foi diluída com água filtrada *overnight* de 30‰

para ~10 - 12‰ ao longo de 4 horas (com fluxo de 0,7 ml/seg) para evitar choque osmótico nos peixes expostos a 5‰. Os peixes permaneceram por 10 - 12 horas em 10 - 12‰, e foram transferidos para 5‰.

Após o período de exposição de 6 horas e de 5 dias às salinidades experimentais de 5‰ e de 35‰, os exemplares de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram anestesiados com benzocaína 80 mg/L dissolvida em etanol na água do aquário de aclimação. Após 2 min, os peixes encontravam-se totalmente anestesiados, não respondendo a estímulos de tato e permaneceram deitados lateralmente no fundo do recipiente. Retirou-se assim o segundo arco branquial do lado direito para imunofluorescência; os arcos branquiais restantes direito e esquerdo e o rim anterior e posterior foram removidos para determinação da atividade ATPásica total e dos triglicerídeos totais. Uma amostra de sangue foi obtida por punção cardíaca para determinação da osmolalidade e cloreto plasmáticos, e hematócrito. Finalmente uma amostra de músculo (0,40 g) foi retirada para determinação do conteúdo de água.

As brânquias foram utilizadas para detecção da enzima Na^+, K^+ -ATPase por serem os principais órgãos responsáveis pela secreção/absorção de íons dos teleósteos durante mecanismos de hipo- e hiper-regulação do plasma.

Ensaio

Imunofluorescência

Os filamentos branquiais foram fixados em paraformaldeído 2% em PBS por 3 horas, em seguida foram encubados em tampão fosfato (PBS) com sacarose 5% por 2 horas, e incubados em PBS com sacarose 15% *overnight* a 4°C. Os filamentos foram embebidos em crioprotetor OCT (Tissue – Tek), e

imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo transferidos para freezer a -20 °C. Os blocos foram cortados em criostato CTD (IEC – International Equipment Company, USA), e cortes de 10-12 µm foram colocados em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão. Os cortes foram lavados com PBS e PBS com glicina 0,1 M, bloqueados em PBS com BSA 1%, e foram incubados em câmara úmida a 4 °C *overnight*, com anticorpo primário $\alpha 5$ (anti- Na^+, K^+ -ATPase, de frango, obtido do Banco de Estudos de Desenvolvimento de Híbridoma, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Iowa, EUA), produzido em camundongo, diluído 1:100 em PBS + BSA 0,1%. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS, bloqueados por 15 min com BSA 1%, e então incubados com anticorpo secundário anti-mouse IgG produzido em cabra, conjugados com fluorocromo fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA) diluído 1:100 em PBS com BSA 0,1% por 1,5 horas, em câmara úmida no escuro, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS, rapidamente lavados com água destilada e finalmente montados com fluormount e lamínula, protegidos da luz. As lâminas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot.

Análise das Imagens

A intensidade da fluorescência nos filamentos branquiais de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram obtidas através de um sistema eletrônico de captura de imagem (CCD monochromatic 1280 x 1024 pixels, 16 bits/pixel, Case Data Manager, Applied Spectral Imaging) acoplado ao fotomicroscópio. As imagens dos filamentos de ambas as espécies foram analisadas através do programa Sigma Scan-Pro (Jandel Corporation). As imagens digitais foram convertidas em

escala de cinza, o contraste foi ajustado para melhorar o sinal e reduzir a fluorescência de fundo. Para cada espécie e condição experimental (salinidade/tempo), foram usados 5-6 animais independentes e 9-13 lamelas secundárias dos cortes sagitais foram analisadas aleatoriamente.

Atividade ATPásica total e Triglicerídeos Teciduais

As brânquias e rins foram homogeneizados em tampão imidazol 10 mM pH 7,5 em homogenizador Potter-S em gelo, seguida de centrifugação a 1000xg por 10 min. O sobrenadante foi incubado com detergente deoxicolato de sódio (0,1 mM por 20 min em gelo), para a quebra dos fragmentos de membrana que viessem a formar vesículas, permitindo que o substrato Tris-ATP (3 mM) pudesse se ligar a todos os sítios de ATP, também em eventuais vesículas formadas com o lado citoplasmático para o interior (*right-side-out*). A atividade enzimática foi detectada através do fosfato inorgânico liberado durante a reação da enzima com o substrato, a 20°C, durante 30 minutos. O fosfato liberado foi revelado através de reagente contendo ácido ascórbico 20%, molibdato de amônio 0,84% em H₂SO₄ 2 N, utilizando-se como padrão uma solução de fosfato de sódio dibásico (NaH₂PO₄) 10 mM. A determinação da absorbância proporcional à concentração de fosfato inorgânico foi realizada em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, EUA), com comprimento de onda de 830 nm (Fiske & Subbarow, 1925). O valor da atividade ATPásica total foi dividido pela concentração de proteínas totais da mesma amostra, obtendo-se o resultando em $\mu\text{mol.mgProteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi determinada através do método do biureto utilizando Kit comercial (Labtest, Brasil), com leitura em espectrofotômetro. Para a determinação dos triglicerídeos

totais dos homogenizados também foi utilizado Kit comercial (Labtest, Brasil), em com leitura em espectrofotômetro.

Dosagens Plasmáticas, Hematócrito e Conteúdo de água

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca com seringa heparinizada, foram centrifugadas por 10 min (2.100xg) para a retirada do plasma, que foi imediatamente congelado a -20°C até o momento das dosagens. A osmolalidade do plasma foi determinada utilizando o micro-osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, EUA). A concentração de cloreto foi determinada utilizando kit comercial (Labtest, Brasil), em espectrofotômetro (470 nm). O hematócrito foi determinado após centrifugação a 12.000 rpm por 10 min, em centrífuga de hematócrito (Presvac, Argentina). Para a determinação do conteúdo de água no músculo, amostras foram pesadas em balança analítica e desidratadas em estufa a 100°C por 24 horas. As amostras foram pesadas novamente e o conteúdo total de água foi expresso em percentagem do peso úmido.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat, com nível de significância de 0,05. Foi realizada ANOVA de duas vias para identificar o efeito do tempo (2 níveis: 6 horas e 5 dias) ou da salinidade (2 níveis: 5‰ e 35‰) nas duas espécies separadamente para todos os dados: intensidade da fluorescência, atividade ATPásica total; triglicerídeos totais, osmolalidade e cloreto plasmáticos, hematócrito e conteúdo de água no músculo. O teste *post hoc* de Tukey foi utilizado para localizar diferenças significativas entre

os grupos. Teste T de *Student* não pareado foi utilizado para comparar os grupos de *S. testudineus* e *S. greeleyi* submetidos ao mesmo tratamento.

3 RESULTADOS

Imunofluorescência da Na^+, K^+ -ATPase

As brânquias de *S. testudineus* e *S. greeleyi* expostos por 6 horas e 5 dias às salinidades 5‰ e 35‰ observadas ao microscópio de fluorescência apresentaram a enzima Na^+, K^+ -ATPase localizada na região interlamelar dos filamentos branquiais onde estão as células de cloreto responsáveis pelo transporte de sal (Fig. 1). O único efeito detectado sobre a intensidade da fluorescência foi sua redução em *S. greeleyi* (Fig. 2B) expostos por 5 dias a 35‰ ($40,4 \pm 2,1$) quando comparada aos baiaicus da mesma espécie expostos por 6 horas a 35‰ ($46,5 \pm 2,0$) ($P=0,036$). Ambas as espécies apresentaram intensidade da fluorescência para Na^+, K^+ -ATPase muito próximas, não apresentando diferença significativa entre si (Fig. 2A,B).

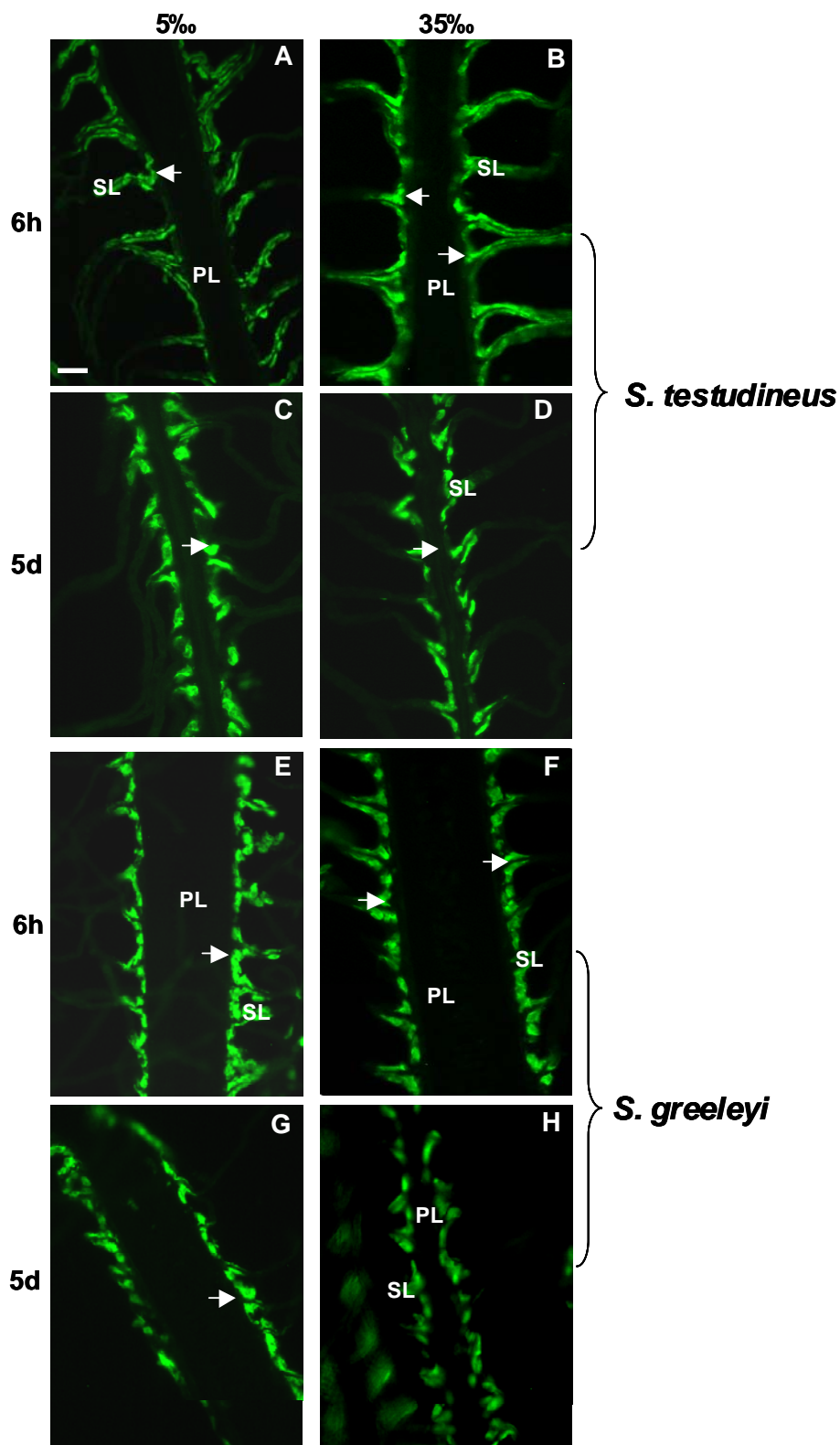


Figura 1: Imunofluorescência da Na⁺,K⁺-ATPase do epitélio branquial de *S. testudineus*, A: 5 ‰, 6 horas (6h); B: 35 ‰, 6h; C: 5 ‰, 5 dias (5d); D: 35 ‰, 5d; e *S. greeleyi*, E: 5 ‰, 6h; F: 35 ‰, 6h; G: 5 ‰, 5d; H: 35 ‰, 5d. As setas indicam a reação positiva para Na⁺,K⁺-ATPase nas células de cloreto na região inter-lamelar, entre a lamela primária (PL) e as lamelas secundárias (SL). A barra de escala em A é válida para todas as figuras de A-H: 50 µm.

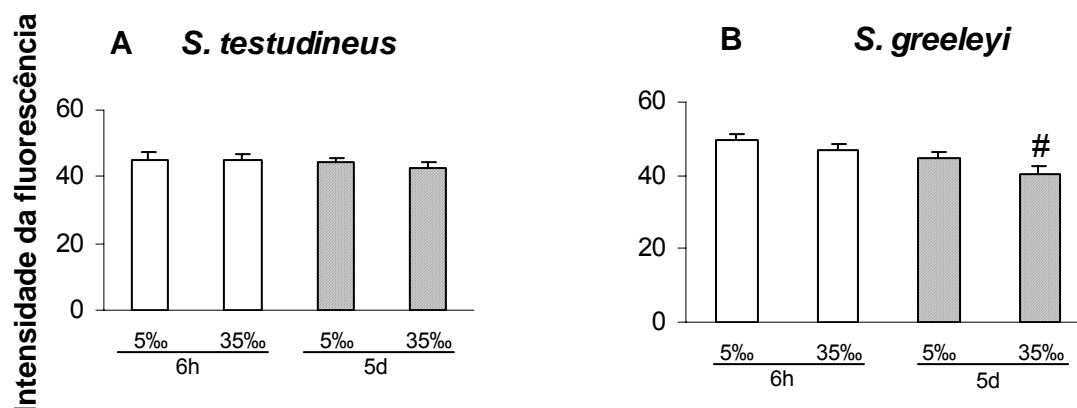


Figura 2: Intensidade da fluorescência (unidade arbitrária) para Na^+, K^+ -ATPase branquial de *S. testudineus* (n=5) (A) e *S. greeleyi* (n=5) (B), após 6 horas (6h) e 5 dias (5d); # efeito do tempo (6 horas \neq 5 dias na mesma salinidade e mesma espécie). $P < 0,05$.

Atividade ATPásica Total

A atividade ATPásica total da brânquia de *S. testudineus* e *S. greeleyi* (Fig. 3A,C) não foi alterada por nenhum dos tratamentos. O rim de *S. testudineus* expostos a 35‰ por 5 dias ($2,17 \pm 0,18 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) aumentou a atividade ATPásica total quando comparado ao rim dos animais expostos a 35‰ por 6 horas ($1,39 \pm 0,24 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P = 0,009$) (Fig. 3B). O rim de *S. greeleyi* reduziu a atividade ATPásica total nos animais após 6 h em 5‰ ($1,35 \pm 0,15 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) quando comparado aos animais em 35‰ ($2,15 \pm 0,32 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P = 0,013$) (Fig. 3D); aumentou em 5‰, 5 dias ($1,98 \pm 0,20 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) quando comparada a 5‰, 6 horas ($1,35 \pm 0,15 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P = 0,039$); e reduziu em 35‰ 5 dias ($1,13 \pm 0,11 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) quando comparada a 35‰, 6 horas ($2,15 \pm 0,32$

$\mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P= 0,020$). A atividade ATPásica total da brânquia foi maior em *S. greeleyi* do que em *S. testudineus* após 6 horas em 5‰ (*S. greeleyi*, $1,71\pm0,17 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$ e *S. testudineus*, $1,17\pm 0,10 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P= 0,016$), e após 6 horas em 35‰ (*S. greeleyi* $1,76\pm0,10 \mu\text{molPi.mgProteína/h-1}$ e *S. testudineus* $1,25\pm0,04 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) ($P=0,0005$). O rim teve menor atividade ATPásica total em *S. greeleyi* ($1,43\pm0,11 \mu\text{molPi.mgProt.h}^{-1}$) comparado a *S. testudineus* ($2,17\pm0,18 \mu\text{molPi.mgProteína.h}^{-1}$) em 35‰ após 5 dias ($P=0,003$).

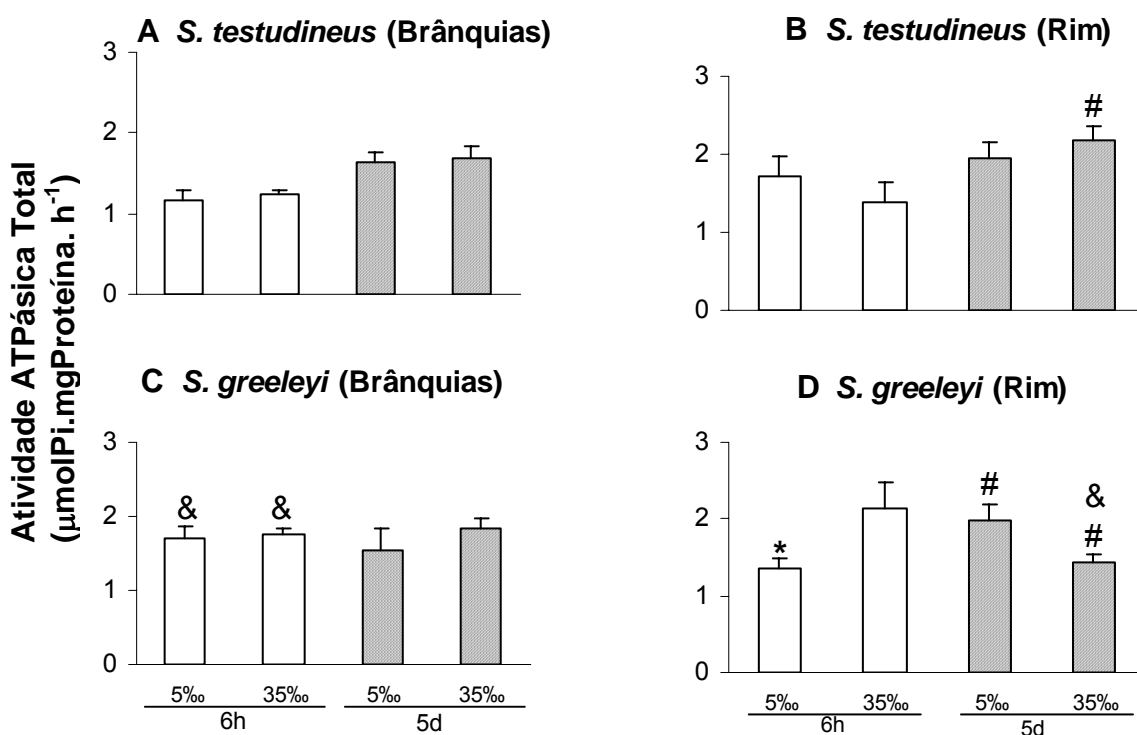


Figura 3: Atividade ATPásica total das brânquias (A) e rim (B) de *S. testudineus* (n: 6-8) e brânquia (C) e rim (D) de *S. greeleyi* (n: 6-12) em 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) em água de salinidade 5‰ ou 35‰. * efeito da salinidade (5‰ \neq 35‰ no mesmo tempo e mesma espécie); # efeito do tempo (6 horas \neq 5 dias na mesma salinidade e mesma espécie); & efeito da espécie (*S. testudineus* \neq *S. greeleyi* na mesma salinidade e mesmo tempo). $P<0,05$.

Triglicerídeos Totais

A concentração de triglicerídeos totais da brânquia de *S. testudineus* (Fig. 4A) foi aumentada em 5‰ após 5 dias ($0,106 \pm 0,01$ mg.Triglicerídeo/mg.Proteína) quando comparada a concentração em 5‰ após 6 horas ($0,082 \pm 0,004$ mg.Triglicerídeo/mg.Proteína) ($P=0,014$). A concentração de triglicerídeos totais dos rins de *S. testudineus* (Fig. 4B), da brânquia (Fig. 4C) e rins (Fig. 4D) de *S. greeleyi* não sofreu alterações com os tratamentos. *S. greeleyi* teve maior conteúdo de triglicerídeos totais nas brânquias e no rim em todas as condições experimentais quando comparado a *S. testudineus*. Nas brânquias de *S. testudineus*, a concentração de triglicerídeos variou de 0,081 a 0,106 mg.Triglicerídeo/mg.Proteína e de *S. greeleyi* de 0,147 a 0,174 mg.Triglicerídeo/mg.Proteína ($P=0,003$). No rim, os triglicerídeos totais variaram de 0,065 a 0,081 mg.Triglicerídeo/mg.Proteína para *S. testudineus* e de 0,119 a 0,137 mg.Triglicerídeo/mg.Proteína para *S. greeleyi*.

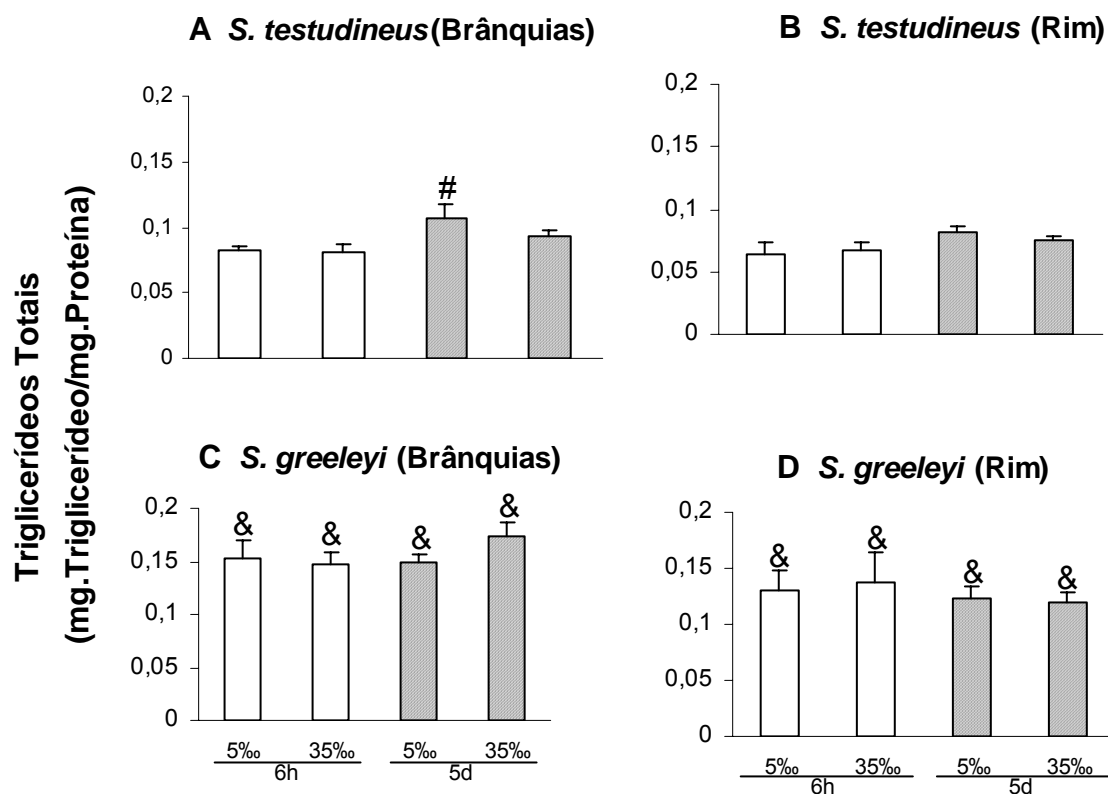


Figura 4: Triglicerídeos totais das brânquias (A) e rim (B) de *S. testudineus* (n=6) e brânquia (C) e rim (D) de *S. greeleyi* (n: 5-9), após 6 horas (6h) ou 5 dias (5d) em água de salinidade 5‰ ou 35‰; # efeito do tempo (6 horas \neq 5 dias na mesma salinidade e mesma espécie); & efeito da espécie (*S. testudineus* \neq *S. greeleyi* na mesma salinidade e mesmo tempo), $P < 0,05$.

Osmolalidade

A osmolalidade do plasma de *S. testudineus* exposto a 5‰ por 6 horas e 5 dias foi reduzida quando comparado aos animais expostos a 35‰ por 6 horas ($P < 0,001$) e 5 dias ($P = 0,012$) (Tab. 1). *S. greeleyi* apresentou mesma resposta na osmolalidade do plasma observada para *S. testudineus*, com redução dos valores em 5‰ 6 horas e 5 dias quando comparados a 35‰ ($P < 0,001$ para ambos os tempos), porém a osmolalidade de *S. greeleyi* foi maior que a osmolalidade de *S. testudineus* após 5 dias em 35‰ ($P = 0,006$) (Tab. 1).

Cloreto

A concentração de cloreto plasmático de *S. testudineus* não sofreu alteração frente a redução de salinidade nos tempos de exposição de 6 horas e 5 dias. A salinidade de 5‰ causou redução no cloreto plasmático de *S. greeleyi* em 6 horas e 5 dias quando comparado a salinidade de 35‰ (6 horas $P=0,029$; 5 dias $P<0,001$) (Tab. 1).

Hematócrito

A salinidade e o tempo de exposição não afetaram o hematócrito de *S. testudineus* (Tab. 1). A exposição à salinidade de 5‰ causou aumento no hematócrito de *S. greeleyi* quando comparado ao seu hematócrito em 35‰, após 5 dias ($P=0,046$) (Tab. 1). O único efeito do tempo (valor em 5 dias diferente do valor em 6 horas) no hematócrito de *S. greeleyi* foi observado para os peixes expostos a 5‰ por 5 dias, apresentado valor maior que para os peixes em 6 horas ($P=0,036$) (Tab. 1). *S. greeleyi* apresentou valores de hematócrito superiores aos de *S. testudineus* após 5 dias nas salinidades de 5‰ ($P=0,0001$) e 35‰ ($P=0,032$) (Tab. 1).

Conteúdo de Água no Músculo

O conteúdo de água no músculo de *S. testudineus* e *S. greeleyi* não foi afetado por nenhum tratamento, sendo estável em aproximadamente 80% (Tab. 1).

Tabela 1: Osmolalidade e cloreto plasmáticos, hematócrito, conteúdo de água no músculo de *S. testudineus* e *S. greeleyi* expostos por 6 horas e 5 dias às salinidades de 5‰ e 35‰.

	Salinidade/ Tempo	<i>S. testudineus</i>	<i>S. greeleyi</i>
Osmolalidade (mOsm.kgH₂O⁻¹)			
	5/6h	308.54±2.37 (n=11)*	304.55±7.13 (n=11)*
	35/6h	343.00±9.43 (n=11)	341.73±3.96 (n=11)
	5/5d	305.58±5.83 (n=12)*	299.0±9.03 (n=11)*
	35/5d	327.08±4.15 (n=13)	347.50±5.49 (n=10)&
Cloreto (mM)			
	5/6h	144.31±2.53 (n=11)	148.94±5.12 (n=11)*
	35/6h	155.23±2.90 (n=11)	161.59±2.36 (n=11)
	5/5d	145.45±11.39 (n=8)	141.00±4.23 (n=11)*
	35/5d	154.03±5.54 (n=13)	166.74±3.64 (n=10)
Hematócrito (%)			
	5/6h	27.89±1.09 (n=9)	30.55±1.19 (n=11)
	35/6h	25.73±1.10 (n=11)	27.36±1.16 (n=11)
	5/5d	25.54±0.77 (n=13)	34.64±2.02(n=11) * # &
	35/5d	25.85±0.80 (n=13)	30.11±1.92 (n=9)&
Conteúdo de água no músculo (%)			
	5/6h	80.72±2.02 (n=6)	81.03±0.31 (n=11)
	35/6h	82.72±0.89 (n=6)	81.28±0.76 (n=11)
	5/5d	79.48±0.68 (n=6)	80.69±0.59 (n=10)
	35/5d	80.10±0.35 (n=7)	79.85±0.85 (n=10)

* efeito da salinidade (5‰ ≠ 35‰ no mesmo tempo e mesma espécie), # efeito do tempo (6 horas ≠ 5 dias na mesma salinidade e mesma espécie), & efeito da espécie (*S. testudineus* ≠ *S. greeleyi* na mesma salinidade e mesmo tempo) com P<0.05.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A presença da Na^+, K^+ -ATPase verificada através da utilização do anticorpo $\alpha 5$ nas células de cloreto branquiais de *S. testudineus* e *S. greeleyi* está de acordo com os resultados obtidos anteriormente para outros teleósteos (Witters et al., 1996; Choe et al., 1999; Wilson et al., 2000a,b; Pelis et al., 2001; Pelis & McCormick, 2001; Lin et al., 2003; McCormick et al., 2003; Lin et al., 2004). O sinal da imunofluorescência não foi modificado com a redução da salinidade de 35‰ para 5‰ após 6 horas e 5 dias de exposição. Este resultado favorece a interpretação de que esta enzima atua tanto nos processos de hipo-regulação em água do mar (35‰), gerando gradiente eletroquímico para secreção de sal através do co-transportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$, quanto na hiper-regulação em água do mar diluída (5‰), gerando gradiente eletroquímico para absorção de sal através da enzima H^+ -ATPase (Evans, 1993; Jobling, 1995; McCormick, 1995; Marshall & Bryson, 1998; Hirose et al., 2003; Kirschner, 2004). A redução na intensidade da fluorescência de *S. greeleyi* em 35‰ após 5 dias pode indicar que após 5 dias de exposição o organismo está totalmente adaptado a água do mar, levando a redução da síntese e/ou degradação das moléculas da Na^+, K^+ -ATPase das células de cloreto, apesar deste ser um processo com alto custo energético para o animal.

Por atuar tanto no sentido de secreção como no de absorção de sal nas células de cloreto (Evans, 1993; Jobling, 1995), a Na^+, K^+ -ATPase responde de forma diferente à exposição a água do mar ou a água do mar diluída/água doce em diferentes espécies de teleósteos eurihalinos estudados. Por exemplo, *Western blot* da brânquia de juvenis da espécie marinha *Chanos chanos* mostrou

elevação da sub-unidade α da Na^+, K^+ -ATPase em água doce quando comparada à salinidade de 35‰ após 15 dias de exposição (Lin et al, 2003); o gobídeo *Stenogobius hawaiiensis*, de forma semelhante, teve a intensidade da fluorescência da Na^+, K^+ -ATPase aumentada nas células de cloreto em água doce após 10 dias (McCormick et al., 2003). Outras espécies apresentaram resultado oposto, o baiacu dulcícola-estuarino *Tetraodon nigroviridis* e o salmão do atlântico (anádromo) *Salmo salar* apresentaram elevação na abundância da sub-unidade α da Na^+, K^+ -ATPase branquial no epitélio branquial após 15 dias em água do mar quando comparada a água doce ou água do mar diluída (Pelis et al., 2001; Lin et al., 2004). As espécies de baiacus *S. testudineus* e *S. greeleyi* por sua vez não apresentaram variação na Na^+, K^+ -ATPase branquial frente à elevação e redução da salinidade, mantendo constante a abundância da enzima para secretar e absorver sal.

A elevação da atividade ATPásica renal de *S. testudineus* em 35‰ após 5 dias comparado à 6 horas ocorreu possivelmente pela necessidade de aumentar a reabsorção de íons monovalentes (Na^+ , K^+ , Cl^-) e secreção de íons divalentes (Mg^{2+} , SO_4^{2-}) no rim durante a hipo-regulação a longo prazo e assim auxiliar na manutenção da composição dos íons extra-celulares (Jobling, 1995; Dantzler, 2003). A redução da atividade ATPásica renal de *S. greeleyi* em 5‰ comparada a 35‰ após 6 horas indica, além da necessidade de secretar e reabsorver íons nas células renais na salinidade elevada como citado anteriormente, possivelmente, maior metabolismo do tecido em água do mar apesar da concentração de triglicerídeos totais ser mantida estável com a redução da salinidade. Cabe observar que a espécie marinha eurihalina *Dicentrarchus labrax*

apresentou resposta contrária, elevou a atividade ATPásica renal com a diluição da água do mar (Venturini et al., 1992).

A maior atividade ATPásica branquial encontrada em *S. greeleyi* comparado a *S. testudineus* após 6 horas em 5‰ e 35‰, pode ser um indício de que *S. greeleyi* aumenta o metabolismo do tecido branquial quando submetido a estresse osmótico em curto prazo, aumentando a energia disponível para o transporte ativo de íons. Esta resposta em *S. greeleyi* seria justificada pela sua preferência por salinidades mais altas na natureza onde normalmente não é submetido a estresse osmótico (Figueiredo & Menezes, 2000; Vendel et al., 2002). No entanto esta explicação não se aplica ao tecido renal, pois a atividade ATPásica do rim de *S. testudineus* submetido a 35‰ por 5 dias foi maior que em *S. greeleyi*. Podemos sugerir com estes resultados que a atividade das ATPases que atuam no tecido branquial durante os mecanismos de hipo- e hiper-regulação do plasma é mantida estável, embora os animais sejam submetidos a extremos de salinidade.

A dosagem de triglicerídeos totais dos homegenizados das brânquias e rins de *S. testudineus* e *S. greeleyi* não apresentou variação significativa entre as condições experimentais, indicando juntamente com a atividade ATPásica total a manutenção estável do metabolismo do tecido branquial, pelo menos em termos de reservas lipídicas. A menor concentração de triglicerídeos nas brânquias de *S. testudineus* em 5‰ 6 horas comparado à 5 dias indica maior gasto de energia e conseqüente depleção de lipídeos para hiper-regulação a curto prazo (6 horas), necessária para produzir energia utilizada na manutenção das concentrações osmóticas e iônicas em água do mar diluída (Woo & Fung, 1981; Woo & Chung,

1995; Jarvis & Ballantyne, 2003). Em todas as condições experimentais *S. greeleyi* apresentou maior concentração de triglicerídeos do que *S. testudineus*, indicando que esta espécie em geral utiliza menos suas reservas metabólicas (lipídeos) durante os processos de hipo-regulação e hiper-regulação do plasma.

Os valores da osmolalidade e cloreto plasmáticos para as duas espécies do gênero *Sphoeroides* assemelharam-se aos valores obtidos para estas espécies em estudos anteriores ($\sim 300 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ e $\sim 150 \text{ mM}$) (Prodocimo & Freire, 2001; 2004) e aos valores de outras espécies de teleósteos marinho-estuarinos (p. ex. Maren et al., 1992; Claiborne et al., 1994; Zadunaisky et al., 1995; Zadunaisky, 1996; Jensen et al., 1998; Marshall et al., 1999). A osmolalidade e o cloreto plasmáticos são parâmetros importantes para demonstrar a capacidade de manutenção da homeostase do líquido extracelular dos teleósteos e suas alterações indicam modificações nesta capacidade. Ocorreu redução da osmolalidade em 5‰ em ambos os tempos em ambas as espécies, como verificado anteriormente (Prodocimo & Freire, 2004). O valor da osmolalidade de *S. greeleyi* após 5 dias em 35‰, sendo maior do que *S. testudineus*, corroborou resultados obtidos anteriormente, e é explicado pela distribuição de *S. greeleyi* em áreas com salinidade mais elevada (Prodocimo & Freire, 2004).

O hematócrito e a concentração de água no tecido muscular são usados como indicadores de estresse osmótico celular/tecidual para teleósteos (Plaut, 1998; Marshall et al., 1999; Claireaux & Audet, 2000; Brown et al., 2001; Martinez-Álvarez et al., 2002). Os valores do hematócrito obtidos para *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram semelhantes aos de outros teleósteos 25-30 % (Plaut, 1998; Claireaux & Audet, 2000; Brown et al., 2001; Martinez-Álvarez et al., 2002), porém

a elevação do hematócrito de *S. greeleyi* em 5‰ comparado a 35‰ após 5 dias foi contrária às respostas observadas para outras espécies de teléosteos submetidas a salinidade reduzida. Em geral salinidades elevadas levam a um aumento do hematócrito após dias de aclimação do animal, devido à perda de água extra-celular para o ambiente hiper-salino e maior necessidade de O₂ (Plaut, 1998; Claireaux & Audet, 2000; Brown et al., 2001; Martinez-Álvarez et al., 2002). Porém, o hematócrito de *S. greeleyi* foi elevado em 5‰ 5 dias quando comparado à 6 horas.

Associado ao hematócrito, o conteúdo de água no tecido muscular reflete resposta tecidual a variações osmóticas. *S. testudineus* e *S. greeleyi* não sofreram alterações no conteúdo de água no tecido muscular com a redução da salinidade. Os valores de ~80% foram semelhantes os valores do conteúdo de água no músculo de outras espécies eurihalinas (Feldmeth & Waggoner, 1972; Plaut, 1998; Kelly & Woo, 1999; Claireaux & Audet, 2000; Brown et al., 2001; Martinez-Álvarez et al., 2002).

Apesar de apresentarem diferença na distribuição na natureza, ambas as espécies apresentaram mecanismos de regulação osmo-iônica semelhantes, e mesmo padrão de resposta às salinidades 5‰ (durante a hiper-regulação) e 35‰ (durante a hipo-regulação). Poucas ou inexistentes alterações na presença imunocitoquímica da Na⁺,K⁺-ATPase branquial, na atividade ATPásica total e na concentração de triglicerídeos na brânquia e no rim; redução da osmolalidade e cloreto plasmáticos em 5‰ indicando possível perda de íons e entrada osmótica de água em ambiente diluído; poucas ou inexistentes alterações no hematócrito e no conteúdo de água do músculo. Todos estes resultados indicam que estas espécies regulam o conteúdo de água das células. A maior concentração de

triglicerídeos na brânquia e rim de *S. greeleyi* indica menor utilização das reservas metabólicas na forma de lipídeos durante os processos de hipo-regulação e hiper-regulação do plasma, apesar de *S. greeleyi* apresentar uma maior atividade ATPásica branquial quando comparada a de *S. testudineus*. A Na^+, K^+ -ATPase mostrou não ser um dos motivos para a maior tolerância de *S. testudineus* à água do mar diluída (5‰), porém a elevação na atividade ATPásica total na reserva de lipídeos em *S. greeleyi* indica que a diferença na utilização nas reservas metabólicas entre as espécies pode estar influenciando a capacidade de tolerar a diluição da salinidade no ambiente natural.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beyenbach, K.W., 1995. Secretory electrolyte transport in renal proximal tubules of fish. In Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds), Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation, v. 14. The Fish Physiology Series. Academic Press, San Diego, pp.85-105.
- Beyenbach, K.W., Baustian, M.D., 1989. Comparative physiology of the proximal tubule. From the perspective of aglomerular urine formation. In KINNE, R.K.H. (Ed), Structure and function of the kidney, v. 1. Comparative Physiology. Karger, Basel, pp. 103–142.
- Beyenbach, K.W., Freire, C.A., Kinne, R.K.H., Kinne-Saffran, E., 1993. Epithelial transport of magnesium in the kidney of fish. Min. Electrol. Metabol. 19, 241-249.

- Bijvelds, M.J.C., Van der Heijden, A.J.H., Flik, G., Verbost, P.M., Kolar, Z.I., Bonga, S.E.W., 1995. Calcium pump activities in the kidney of *Oreochromis mossambicus*. J. Exp. Biol. 198,1351-1357.
- Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. J. Fish Biol. 59, 1544 – 1555.
- Choe, K.P., Edwards, S., Morrison-Shetlar, A.I., Toop, T., Claiborne, J.B., 1999. Immunolocalization of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPase in mitochondrion-rich cells of the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) gill. Comp. Bioch. Physiol. 124A, 161-168.
- Claiborne, J.B., Walton, J.S., Compton-Mccullough, D., 1994. Acid-base regulation, branchial transfers and renal output in a marine teleost fish (the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*) during exposure to low salinities. J. Exp. Biol. 193, 79–95.
- Claireaux, G., Audet, C., 2000. Seasonal changes in the hypo-osmoregulatory ability of brook charr: the role of environmental factors. J. Fish Biol. 56, 347-373.
- Dantzler, W.H., 2003. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. Comp. Biochem. Physiol. 136A, 453 – 478.
- Doneen, B.A., 1993. High-affinity $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ -ATPase in kidney of euryhaline *Gillichthys mirabilis*: kinetics, subcellular distribution and effects of salinity. Comp. Bioch. Physiol. 106B, 719-728.
- Evans, D.H., 1993. The Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Feldmeth, C.R., Waggoner, III J.P., 1972. Field measurements of tolerance to extreme hypersalinity in the California killifish, *Fundulus parvipinnis*. Copeia 592-594.

- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI Teleostei (5). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-388.
- Freire, C.A., Kinne, R.K.H., Kinne-Saffran, E., Beyenbach, K.W., 1996. Electrodifusive transport of Mg across renal membrane vesicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol. 270, F739-F748.
- Flik G., Van Der Velden J.A., Dechering K.J., Verbost P.M., Schoenmakers T.J.M., Kolar Z., Wendelaar Bonga S.E., 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: A Review. J. Exp. Zool. 265, 356–365.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill Morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 107–115.
- Hentschel, H., Elger, M., 1989. Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. In: Kinne, R.K.H. (Ed), Structure and Function of the Kidney, vol. 1. Comparative Physiology. Karger, Basel, pp. 1 - 72.
- Hentschel, H., Zierold, K., 1994. Morphology and element distribution of magnesium-secreting epithelium: the proximal tubule segment PII of dogfish, *Scyliorhinus caniculus* (L.). Eur. J. Cell Biol. 63, 32–42.
- Hentschel, H., Mähler, S., Herter, P., Elger, M., 1993. Renal tubule of dogfish, *Scyliorhinus caniculus*: A comprehensive study of structure with emphasis on intramembrane particles and immunoreactivity for H^+ - K^+ -Adenosine Triphosphatase. The Anatomical Record 235, 511–532.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. Comp. Biochem. Physiol. 136B, 593-620.

- Jarvis, P.L., Ballantyne, J.S., 2003. Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum*. *Aquaculture* 219, 891-909.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282, 290-300.
- Jobling, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London.
- Katoh F., Hyodo S., Kaneko T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branquial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 206, 793-803.
- Kelly, S.P., Woo, N.Y.S., 1999. The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *J. Fish Biol.* 55, 732-750.
- Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207:1439-1452.
- Lin, Y.M., Chen, C.N., Lee, T.H., 2003. The expression of gill Na,K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A, 489-497.
- Lin, Y.M., Tsai, R.S., Lee, T.H., 2004. Expression and distribution of Na,K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol.* 138A, 287-295.
- Maren, T.H., Fine, A., Swenson, E.R., Rothman, D., 1992. Renal acid-base in marine teleost, the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *Am. J. Physiol.* 263, F49-F55.

- Marshall, W.S., 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. J. Exp. Zool. 293,264–283.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., 1998. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 97-106.
- Marshall, W.S., Emberley, T.R., Singer, T.D., Bryson, S.E., McCormick, S.D., 1999. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. J. Exp. Biol. 202,1535–1544.
- Martínez-Álvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. J. Exp. Biol. 205, 3699 – 3706.
- McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. In Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds), Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation, vol. 14. Fish Physiology series. Academic Press, San Diego, pp. 285-315.
- McCormick, S.D., Sundell, K., Björnsson, B.T., Brown, C.L., Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the localization of Na^+ / K^+ -ATPase, Na^+ / K^+ /2 Cl^- cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). J. Exp. Biol. 206, 4575 – 4583.
- Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na^+ - K^+ -2 Cl^- cotransporter localization and abundance in the gills of atlantic salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 124, 134 – 143.

- Pelis, R.M., Zydlewski, J., McCormick, S.D., 2001. Gill $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ cotransporter abundance and location in atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am. J. Physiol.* 280, R1844 - R1852.
- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- Perry, S.F., Reid, S.G., Wankiewicz, E., Iyer, V., Gilmour, K.M., 1996. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. *Physiol. Zool.* 69(6), 1419-1441.
- Philpott, C.W., 1980. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. *Am. J. Physiol.* 238, R171-R184.
- Plaut, I., 1998. Comparison of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. *Fish Physiol. Biochem.* 19,181–188.
- Prodocimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262, 243-253.
- Prodocimo, V., Freire, C.A., 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 37, 1-5.
- Randall, D.J., Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 3-8.
- Stahl, W.L., Baskin, D.G., 1990. Histochemistry of ATPases. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1099-1122.

- Sullivan, G.V., Fryer, J.N., Perry, S.F., 1995. Immunolocalization of proton pumps (H^+ -ATPase) in pavement cells of rainbow trout gill. J. Exp. Biol. 198, 2619-2629.
- Van Der Heijden, A.J.H., Verbost, P.M., Bijvelds, M.J.C., Atsma, W., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. Effects of sea water and stanniectomy on branchial Ca^{+2} handling and drinking rate in eel (*Anguilla anguilla* L.). J. Exp. Biol. 202, 2505-2511.
- Vendel, A.L., Spach, H.L., Lopes, S.G., Santos, C., 2002. Structure and dynamics of fish assemblages in a tidal creek environment. Braz. Arch. Biol. Technol. 45, 365 – 373.
- Venturini, G., Cataldi, E., Marino, G., Pucci, P., Garibaldi, L., Bronzi, P., Cataudella, S., 1992. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, PISCES, PERCIFORMES) during acclimation trials to fresh water. Comp. Biochem. Physiol 103A, 451-454.
- Wilson, J.M., Laurent, P., Tufts, B.L., Benos, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Randall, D.J., 2000a. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to of ion-transport protein localization. J. Exp. Biol. 203, 2297-2310.
- Wilson, J.M., Randall, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Ip, A.K.Y., 2000b. Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). J. Exp. Biol. 203, 2297 - 2310.

- Witters, H., Berckmans, P., Vangenechten, C., 1996. Immunolocalization of Na^+,K^+ -ATPase in the gill epithelium of rainbow trout, *Oncorhynchus Mykiss*. Cell Tissue Res. 283, 461-468.
- Woo, N.Y.S., Chung, K.C., 1995. Tolerance of *Pomacanthus imperator* to hypoosmotic salinities: changes in body composition and hepatic enzyme activities. J. Fish Biol., 47, 70-81.
- Woo, N.Y.S., Fung, A.C.Y., 1981. Studies on the biology of the red sea bream, *Chrysophrys major* – II. Salinity adaptation. Comp. Biochem. Physiol 69A, 237-242.
- Zadunaisky, J.A., 1996. Chloride cells and osmoregulation. Kidney Int., 49, 1563-1567.
- Zadunaisky, J.A., Cardona, S., Au, L., Roberts, D.M., Fisher, E., Lowenstein, B., Cragoe Jr., E.J. 1995. Chloride transport activation by osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. J. Membr. Biol. 143, 207–217.

**CAPÍTULO 3: GLOMÉRULOS E TÚBULOS RENAIIS SÃO RESTRITOS AO RIM
ANTERIOR NO ADULTO DO BAIACU ESTUARINO *Sphoeroides testudineus*¹**

¹Artigo Publicado no Journal of Fish Biology 63: 1258-1265, Prodocimo & Freire, 2003

SUMÁRIO

RESUMO	81
ABSTRACT	82
1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAIS E MÉTODOS	83
3 RESULTADOS	86
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	91
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

RESUMO

O baiacu *Sphoeroides testudineus*, uma espécie tropical eurihalina estuarina abundante no oceano Atlântico ocidental encontrado no sul do Brasil (em salinidades entre 0‰ e 34‰) possui rim anterior (porção cranial vermelha) grande e espalhado lateralmente, e um rim posterior (porção caudal) bem fino e pálido. Quando estudado sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, o rim anterior apresentou glomérulos e túbulos renais cercados por tecido hematopoiético. Estes túbulos parecem drenar para o interior de um grande duto coletor convoluto com um lúmen largo e formado por um denso epitélio pseudo-estratificado, denominado de duto mesonéfrico. Este duto coletor constitui a única estrutura do rim posterior. Microvilos apicais foram observados nos túbulos renais e no duto mesonéfrico, e mitocôndrias basais e dobramentos de membrana foram observados nos túbulos renais. Mitocôndrias abundantes basais e vesículas elétron-densas localizadas principalmente no citoplasma apical, foram observadas ao longo de todo o comprimento do duto mesonéfrico. Aposomos (*blebs*) foram freqüentemente observados no duto mesonéfrico na microscopia de luz e na microscopia eletrônica. Este baiacu estuarino eurihalino revelou possuir um tipo raro de rim.

ABSTRACT

The kidney of the pufferfish *Sphoeroides testudineus*, an abundant tropical euryhaline estuarine species of the western Atlantic Ocean found in southern Brazil (in salinities ranging from 0‰ to 34‰) has a large and laterally spread cranial red portion, and a very thin and pale caudal portion. When studied under light and transmission electron microscopy, the cranial kidney displayed glomeruli and renal tubules surrounded by haematopoietic tissue. These tubules appeared to drain into a single large convoluted collecting duct with a wide lumen and thick pseudostratified epithelium, the mesonephric duct, which constituted the sole structure of the caudal kidney. Apical microvillae were viewed in the renal tubules, as well as in the mesonephric duct. Basal mitochondria and membrane infoldings were observed in the renal tubules. Abundant more basally-located mitochondria and electron-dense vesicles, mainly in the apical cytoplasm, were observed along the entire length of the mesonephric duct. Aposomes (blebs) were frequently observed in the mesonephric duct, both by light- and electron-microscopy. This euryhaline estuarine pufferfish has thus been revealed to possess a rare type of kidney.

1 INTRODUÇÃO

Nos peixes, o rim e as brânquias trabalham em conjunto realizando a regulação osmótica e iônica do fluido extracelular. O rim da maioria dos teleósteos marinhos apresenta néfrons simples e reduzido número de glomérulos quando comparados às espécies dulcícolas. *Sphoeroides testudineus* (L.) é uma espécie de baiacu marinho estuarino amplamente distribuído no Oceano Atlântico desde os EUA até o estado de Santa Catarina, Brasil. No estado do Paraná, este baiacu é encontrado em água com salinidade variando de 34‰ a 0‰ (Nardi, 1999). Outras espécies de Tetraodontiformes foram previamente descritas como aglomerulares (*Diodon* sp. and *Tetrodon* sp.) (Edwards, 1928; Hickman & Trump, 1969), embora não existam descrições morfológicas da estrutura fina de seus néfrons. O objetivo do presente estudo foi preencher esta lacuna, descrevendo a morfologia e a ultraestrutura do rim e dos túbulos renais de *Sphoeroides testudineus* espécie eurihalina estuarina, a qual apresentou-se como eficiente hipo- e hiper-regulador dos íons plasmáticos (Prodocimo & Freire, 2001).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de *S. testudineus* foram coletados na gamboa do rio Baguaçu (25°33'S; 48°23'W), na margem sul da Baía de Paranaguá, Paraná Brasil. A salinidade no local da coleta variou amplamente com o ciclo de maré, apresentando valores entre 0‰ e 32‰ (Nardi, 1999). Os animais foram obtidos durante a subida da maré (salinidade ~30‰) utilizando rede de espera do tipo fyke fixa nas bordas, cruzando o canal de maré. A rede permaneceu no canal de

maré por ~6 h até o pico da maré cheia, quando os animais foram retirados. Os baiacus foram coletados durante sua tendência natural de migrar para o interior do estuário com a subida da maré. Após chegar ao laboratório, os peixes foram mantidos em tanque estoques de 250 L com água do local da coleta, salinidade ajustada para 30‰ através da adição de água filtrada em água do mar 35‰, temperatura entre 19°C e 22°C e aeração constante.

Neste estudo foram utilizados um total de 16 peixes adultos com comprimento total médio de 15 cm (CT). Os peixes foram anestesiados utilizando MS-222 0,04% na água do aquário. Após 1–2 min, os peixes não apresentaram mais atividade locomotora e foram imediatamente abertos através de incisão ventral. Os órgãos internos foram removidos, expondo o rim anterior (cranial) hematopoiético, bilobado, volumoso e vermelho e o rim posterior (caudal) (comprimento entre 20–25mm) delicado, fino, branco e cilíndrico (Fig. 1a). Rins de 10 animais foram processados para microscopia eletrônica de transmissão, sendo divididos em pequenas porções de ~3mm de comprimento. Desta maneira o rim anterior foi examinado ao longo de todo o seu comprimento, através de 68 lâminas com pelo menos 10 cortes semi-finos em cada lâmina. As porções de tecido renal foram fixadas por imersão em fixador (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 200mM em tampão cacodilato de sódio 100 mM, NaCl 100 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 3 mM, pH 7,5) em gelo por 2 h. As concentrações dos eletrólitos foram próximas dos valores plasmáticos desta espécie e de outros teleósteos marinhos (Evans, 1993; Prodocimo & Freire, 2001). Os fragmentos renais foram lavados em tampão cacodilato de mesma concentração dos componentes do fixador, porém sem conter os aldeídos (pH 7,5). Em seguida foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato (pH 7,5),

contendo novamente os mesmos sais, por 1,5 h em gelo. As amostras foram desidratadas em série alcoólica, transferidas para óxido de propileno e embebidas em resina Araldite 502 (Polysciences). Cortes semi-finos (500 nm) e finos (50 nm) foram obtidos utilizando ultramicrotomo Leica Ultracut UCT; os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina 1% (em borax 1%) e fotografados. Os cortes finos foram contrastados com acetado de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1200 EXII).

Seis outros animais foram processados para microscopia de luz. Cortes seriais do rim anterior hematopoiético foram realizados para análise do diâmetro do glomérulo (Sigma Scan-Pro) ao longo de todo seu comprimento. Um total de 34 lâminas foram preparadas a partir do rim anterior de 4 animais, com 8 lâminas para cada rim, permitindo a análise de todo o rim anterior. Cada lâmina tinha 9 cortes consecutivos. Dos 9 cortes em cada lâmina, 3 foram analisados, o primeiro, o último e um intermediário. Todos os 306 cortes foram cuidadosamente examinados, mas apenas 24 cortes tiveram seus glomérulos contados e mensurados, totalizando 111 glomérulos uniformemente distribuídos entre os 4 rins utilizados. Este procedimento assegurou que o mesmo glomérulo não fosse mensurado duas vezes. Outros 2 peixes tiveram seus rins posteriores examinados sob microscopia de luz para investigar a estratificação do epitélio do duto mesonéfrico, que não pode ser visualizado facilmente nos cortes semi-finos corados com azul de toluidina. Os fragmentos foram fixados por imersão na solução fixadora Alfac (8,5 ml de etanol 80%, 1 ml de formaldeído 40% e 0,5 ml de ácido acético glacial) por 16 h. Após desidratação em álcool (80–100%), o material foi submerso brevemente em xilol (três vezes de 1 min) e transferido para

resina Histosec (Merck). Os cortes (6 μm) foram obtidos utilizando micrótomo Leica RM 2145, foram corados com hematoxilina-eosina e fotografados. Exceto os glomérulos, os quais foram diretamente mensurados utilizando imagens digitalizadas através do microscópio, a dimensão das estruturas foi calculada a partir da ampliação final das micrografias eletrônicas e de luz.

3 RESULTADOS

Um exame morfológico do rim revelou a presença de glomérulos e túbulos renais no rim anterior, envolto por tecido hematopoiético abundante (Fig. 1). Cortes seriados ao longo de todo o comprimento do rim anterior revelaram a presença de glomérulos com tamanho regular (Figs. 1c–h). A média de diâmetro dos glomérulos medidos em microscopia de luz para todos os animais analisados (111 glomérulos) foi de $35,21 \pm 0,50 \mu\text{m}$ (média \pm erro padrão). Foi observado no rim da cabeça o começo de um único e largo duto mesonéfrico convoluto (Figs. 1b, 1c). Não foi encontrada bexiga urinária em *S. testudineus*.

Os túbulos do rim anterior apresentaram microvilos apicais, porém sem borda em escova (Fig. 2a), e mitocôndrias basais envolvidas por dobramentos de membrana (Fig. 2b). O duto mesonéfrico apresentou diâmetro de 0.3-1 mm estendendo-se para a porção caudal do corpo, transformando-se na única estrutura da porção posterior do rim, rodeada por tecido conjuntivo e tecido muscular liso (Figs. 3a–3c). O epitélio do duto mesonéfrico apresentou-se homogêneo em todo o seu comprimento: espesso e pseudo-estratificado (espessura de $225 \mu\text{m}$), com núcleos concentrados na região basal das células (Fig. 3d). Mitocôndrias pequenas localizadas mais basalmente foram observadas

ao longo de todo o comprimento do duto. A membrana luminal-apical apresentou alguns microvilos e numerosos complexos juncionais intercelulares sub-apicais com desmossomos (Fig. 3e).

Em todos os animais investigados e ao longo de todo o comprimento do duto mesonéfrico foram observadas vesículas elétron-densas, principalmente próximas à membrana luminal. O conteúdo destas vesículas era normalmente escuro, elétron-denso, mas ocasionalmente mais granular (Fig. 3f). Sob microscopia de luz e eletrônica de transmissão foram observados apossomas (*blebs*) na membrana luminal do duto mesonéfrico (Fig. 1b) de 70% dos rins examinados (Fig. 3g), com células liberando quantidade significativa de material citoplasmático no lúmen tubular.

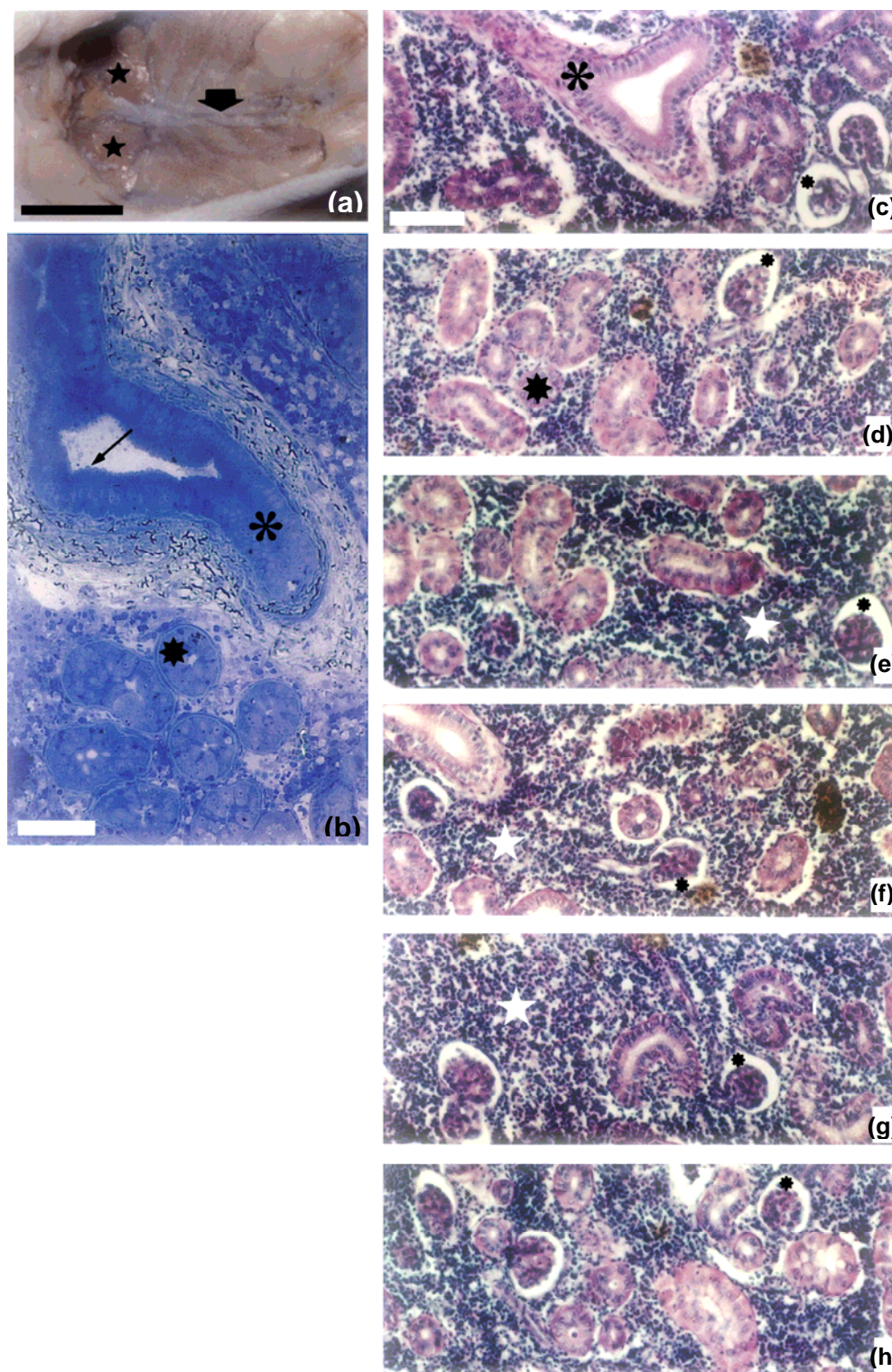


FIGURA 1. (a) Fotografia de *S. testudineus* mostrando a localização do rim anterior (★) e do rim posterior (➡), barra de escala: 1 cm; (b) micrografia de luz do rim da cabeça com túbulos abundantes (★), e ducto mesonéfrico (*) apresentando apóssomas luminiais (→), barra de escala: 50 μm; (c)–(h): micrografias de luz de cortes seriados do rim anterior com túbulos (★), tecido hematopoiético (☆), glomérulos (●), e ducto mesonéfrico (*), barra de escala 50 μm .

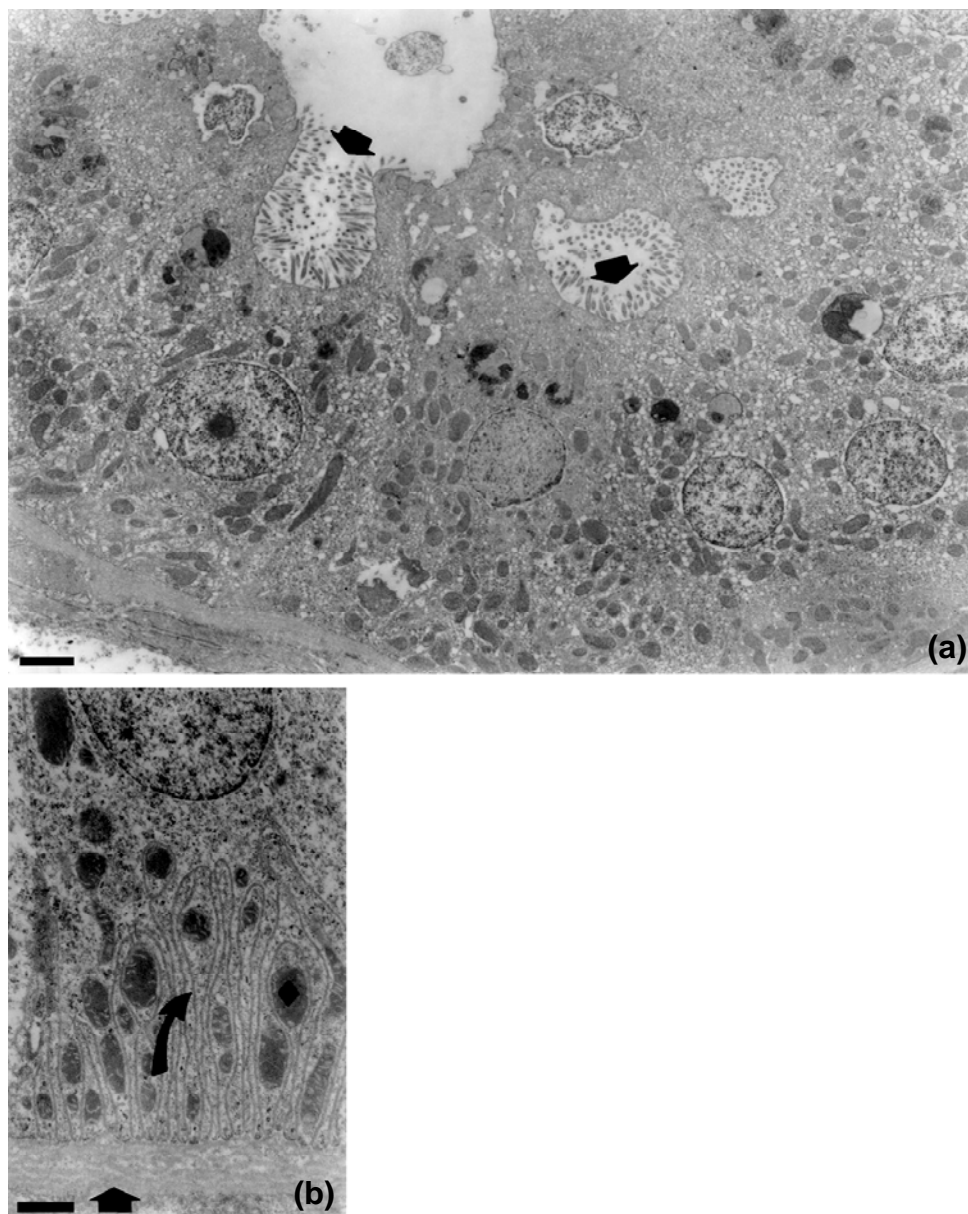


FIGURA 2. Micrografia eletrônica dos túbulos do rim anterior de *S. testudineus*. (a) Túbulo com microvilos (➡) na membrana apical. Barra de escala: 2 μm ; (b) Região basal do túbulo com mitocôndria (◆) e dobramentos de membrana (↗) sustentados por uma espessa membrana basal (➡). Barra de escala: 1 μm .

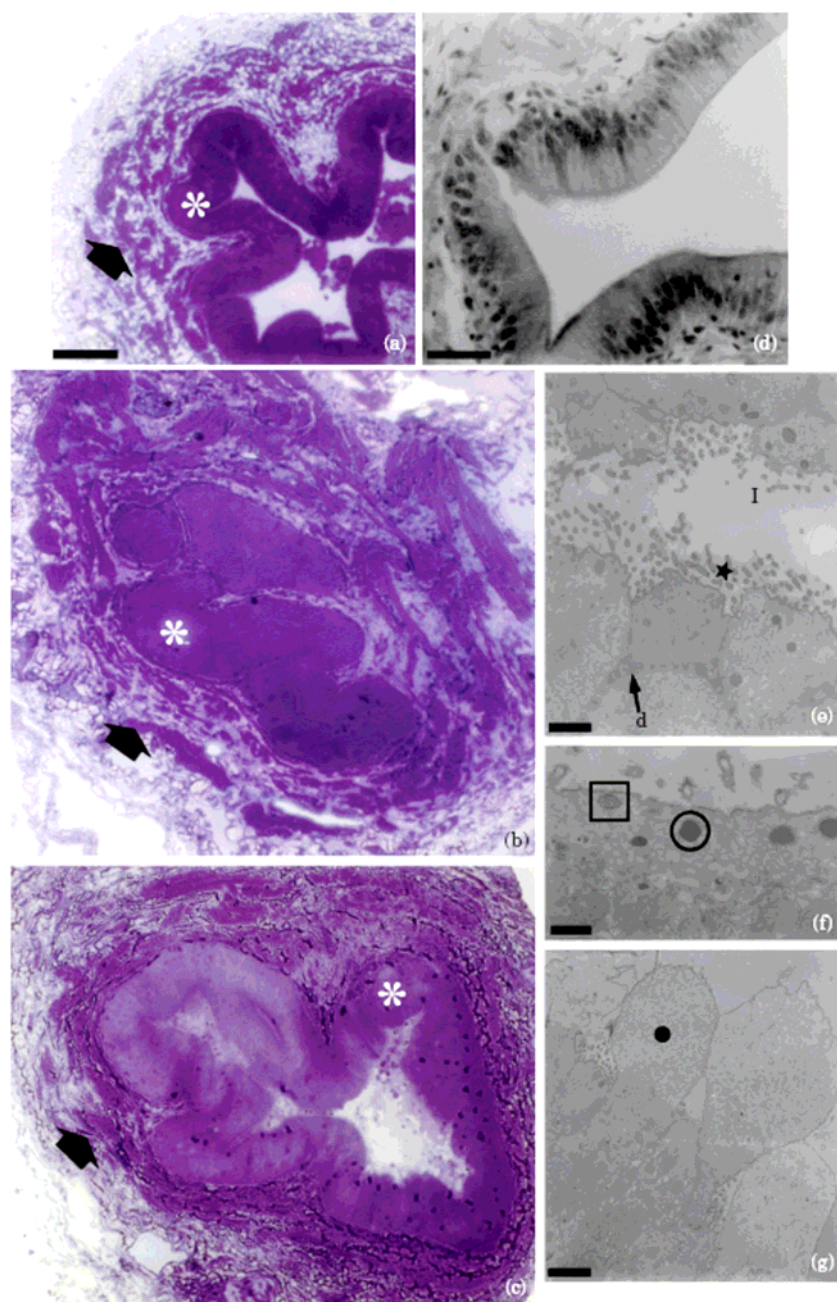


Figura 3: Micrografias de luz e eletrônica do duto mesonéfrico no rim posterior de *S. testudineus*. (a–c) Micrografias de luz de cortes seriados do rim caudal mostrando o duto mesonéfrico (*) rodeado por tecido conjuntivo e tecido muscular liso (➡), barra de escala 50 μ m (a–c); (d) micrografia de luz mostrando epitélio pseudo-estratificado com núcleos basais, barra de escala: 25 μ m; (e) micrografia eletrônica mostrando lúmen (L), membrana apical com microvilos (★), e região de contato intercelular rica em desmossomos (➡), barra de escala: 1 μ m; (f) micrografia eletrônica da membrana luminal mostrando dois tipos de vesículas (□;○), barra de escala: 500 nm; (g) micrografia eletrônica da membrana luminal mostrando apossomas apicais (●). Barra de escala: 2 μ m.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O rim do baiacu estuarino *S. testudineus* sob microscopia de luz apresentou-se incomum, quando comparado ao rim da maioria dos teleósteos com ou sem glomérulos (Audigé, 1910; Edwards, 1928; Hickman & Trump, 1969; Safer et al., 1982; Hentschel & Elger, 1989). A peculiaridade do rim de *S. testudineus* consiste na presença de glomérulos e túbulos funcionais rodeados por abundante tecido hematopoiético apenas no rim anterior, e total ausência destas estruturas no rim posterior. A presença de túbulos funcionais no rim anterior é raro entre peixes adultos (Gérard, 1958), mas foi reportado para *Fundulus heteroclitus* L., *Callionymus lyra* L., *Liparis vulgaris* Fleming e *Cottus bubalis* Euphrasen (Gérard, 1958), e para o “mudskipper” eurihalino *Periophthalmus koelreuteri* L. (Gérard, 1958; Safer et al., 1982). Os túbulos proximais de *S. testudineus* não apresentaram a densa borda em escova usual, mas abundantes microvilos como ocorre em alguns peixes (Hickman & Trump, 1969; Hentschel & Elger, 1989). O rim posterior de *S. testudineus* é composto por apenas um ducto mesonéfrico, que pode alcançar nos animais maiores 1 mm de diâmetro e coletar o fluido produzido pelos túbulos anteriores. O ducto mesonéfrico apresentou-se rodeado por camadas de tecido conjuntivo e de músculo liso, típico de segmentos distais do rim de peixes (Bulger & Trump, 1968; Anderson & Loewen, 1975).

Entre os tipos de rim classificados por Audigé (1910), o rim de *S. testudineus* parece ser do tipo I. Este tipo apresenta um rim anterior funcional, mas o rim posterior é ausente ou raramente detectável (Audigé, 1910; Möllendorf, 1930). Este grupo inclui os gobídeos, que possuem túbulos renais pronéfricos

funcionais (Audigé, 1910; Möllendorf, 1930; Safer et al., 1982). Glomérulos pronéfricos são grandes (Tytler, 1988); no gobídeo *Lepadogaster gouanii* Risso mediu 200–300 μm (Möllendorf, 1930), quase 10 vezes o tamanho do glomérulo de *S. testudineus*, o que sugere que os néfrons do rim anterior destes baiacus não são pronéfricos, mas opistonéfricos. O rim de *S. testudineus* também se encaixa na classificação apresentada por Hentschel & Elger (1989) como tipo “i” (rim opistonéfrico e com órgão linfóide no rim anterior) na Fig. 1 deste estudo, como o rim de ciprinodontídeos.

Os apossomos ou *blebs* freqüentemente detectados no duto mesonéfrico (Figs. 1b e 3g), poderiam ser consequência de atividade secretória apócrina (Chia & Koss, 1994; Aumueller et al., 1999). Estas estruturas não são artefatos de fixação, uma vez que os animais foram anestesiados, imediatamente sacrificados e as porções do rim foram removidas para fixação como descrito no Material e Métodos. Além disso, é possível observar que material rodeando os apossomas é claramente bem preservado (Figs. 1b e 3g). Apossomas até onde se sabe, nunca foram reportados para o rim de peixes. Eles são um fenômeno fisiológico reportado para diversos tecidos como em células T2 na gastroderme do estômago de asteróidea (Chia & Koss, 1994), ou no epitélio relacionado com a reprodução, como no epidídimo e na próstata, nas glândulas mamárias, e glândulas sudoríparas apócrinas (Aumuller et al., 1999). A função dos apossomas ou *blebs* (secreção apócrina) é a secreção de material protéico (Aumueller et al., 1999). Se este tipo de secreção é sempre de natureza peptídica, não pode ser aferida nenhuma função para esta atividade secretória no rim de *S. testudineus* até o presente momento.

As vesículas elétron-densas (Fig. 3f) observadas ao longo de todo o comprimento do ducto mesonéfrico em todos os animais examinados podem conter muco. Vesículas escuras de muco foram descritas para “bowfin” *Amia calva* L. por Youson & Butler (1988) no segmento coletor. De fato, a secreção de muco pelas células do ducto é comum para teleósteos (Hickman & Trump, 1969; Hentschel & Elger, 1989). A maioria das micrografias mostra células secretoras de muco no rim de peixes, no entanto, apresentam vesículas esbranquiçadas, como em *Parophrys vetulus* Girard (Bulger & Trump, 1968; Hickman & Trump, 1969). A densidade de vesículas no citoplasma é relativamente baixa no rim deste baiacu, quando comparada à densidade elevada normalmente encontrada nas células secretoras de muco (Youson & Butler, 1988). Como a composição do material dentro das vesículas e sua direção de tráfico no citoplasma não podem ser confirmadas até a presente data, a natureza das vesículas do ducto mesonéfrico é apenas especulativa.

O presente estudo contribuiu para o conhecimento do rim de peixes, o qual pode ser muito diverso em sua morfologia e estrutura. Um rim muito simplificado foi encontrado em *S. testudineus*, apesar do fato desta espécie habitar um ambiente estuarino com estresse osmótico diário.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, B.G., Loewen, R.D., 1975. Renal morphology of freshwater trout. *Am. J. Anatomy* 143, 93–114.
- Audigé, J., 1910. Contribution à l'étude des reins des poissons téléostéens. *Archives de Zoologie Experimentale et Générale* 5, 275–624.

- Aum Mueller, G., Wilhelm, B., Seitz, J., 1999. Apocrine secretion: fact or artifact? *Ann. Anatomy* 181, 437–446.
- Bulger, R.E., Trump, B.F., 1968. Renal morphology of the english sole (*Parophrys vetulus*). *Am. J. Anatomy* 123, 195–225.
- Chia, F.S., Koss, R., 1994. Asteroidea. In: Harrison, F.W., Chia, F. (Eds), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Echinodermata*, vol. 14. Wiley-Liss, New York, pp. 169–245.
- Edwards, J.G., 1928. Studies on aglomerular and glomerular kidneys. *Am. J. Anatomy* 42, 75–107.
- Evans, D.H., 1993. *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton.
- Gérard, P., 1958. Appareil excreteur. In: Grassé, P. P. (Ed.), *Traité de Zoologie*, Tome XIII. Masson et Cie, Paris, pp. 1555–1557.
- Hentschel, H., Elger, M., 1989. Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. In: Kinne, R.K.H. (Ed), *Structure and Function of the Kidney*, vol. 1. *Comparative Physiology*. Karger, Basel, pp. 1 - 72.
- Hickman, C.P. Jr, Trump, B.F., 1969. The kidney. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds), *Fish Physiology*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 91–239.
- Möllendorf, W.V., 1930. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Verlag von Julius Springer, Berlin.
- Nardi, M., 1999. *Assembléia de peixes em um ambiente de gamboa*. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Prodócimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262, 243–253.

- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- Safer, A.M.A., Tytler, P., El-Sayed, N., 1982. The structure of the head kidney in the mudskipper, *Periophthalmus koelreuteri* (Pallas). *J. Morphol.* 174, 121–131.
- Tytler, P., 1988. Morphology of the pronephros of the juvenile brown trout, *Salmo trutta*. *J. Morphol.* 195, 189–204.
- Youson, J.H., Butler, D.G., 1988. Morphology of the kidney of adult bowfin, *Amia calva*, with emphasis on “renal chloride cells” in the tubule. *J. Morphol.* 196, 137–156.

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DOS FLUXOS UNIDIRECIONAIS DE Na^+ E Ca^{2+} EM
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES TELEÓSTEOS EURIHALINOS, *Fundulus*
heteroclitus E *Oncorhynchus mykiss* SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES
AGUDAS NA SALINIDADE¹**

¹Artigo em preparação para ser submetido ao Journal of Comparative Physiology B, Prodocimo et al., 2006.

SUMÁRIO

RESUMO	98
ABSTRACT	99
1 INTRODUÇÃO	100
2 MATERIAIS E MÉTODOS	103
3 RESULTADOS	110
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	119
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

RESUMO

Os teleósteos eurihalinos são modelos adequados para estudar alterações nos fluxos iônicos unidirecionais. Possuem capacidade de tolerar amplas variações de salinidade, possivelmente modificando fluxos unidirecionais e até revertendo fluxos resultantes de íons através dos epitélios de interface. Não se sabe ao certo o que ocorre com peixes estuarinos sujeitos a variação de salinidade com o ciclo de maré de ~6 horas. Este estudo teve como objetivo determinar os fluxos unidirecionais de Na^+ e Ca^{2+} em *F. heteroclitus* e *O. mykiss* durante a elevação gradual da salinidade ao longo de 6 horas, simulando a maré enchente. Os resultados indicaram que a espécie eurihalina estuarina (*F. heteroclitus*) e a espécie eurihalina dulcícola (*O. mykiss*) apresentam diferentes padrões na modulação do fluxo iônico frente ao estresse da rápida elevação da salinidade. *F. heteroclitus* aumenta as taxas de influxo e efluxo de Na^+ com a elevação da salinidade ao longo de 6 horas, mantendo a homeostase deste íon sem alterar suas concentrações corporais. Este resultado confirma a capacidade que esta espécie possui de tolerar a elevação diária da salinidade com subida da maré em seu ambiente natural. Os fluxos de Ca^{2+} indicam que *F. heteroclitus* tende a perder Ca^{2+} para o ambiente mesmo com ambiente rico em Ca^{2+} . Em *O. mykiss* a elevação gradual da salinidade levou à perda da capacidade de manutenção das concentrações de Na^+ e Ca^{2+} plasmáticas devido ao aumento no influxo de ambos os íons. Como esta espécie não é submetida regularmente a elevação de salinidade em seu ambiente natural, não consegue ativar de forma eficaz mecanismos que mantenham a homeostase dos íons Na^+ e Ca^{2+} em água do mar em curto período de tempo.

ABSTRACT

Euryhaline teleosts are adequate models for the investigation of changes in unidirectional ion fluxes in different salinities. These fish are able to tolerate to widely variable salinities, possibly shutting off unidirectional fluxes and even reverting the direction of net fluxes across their interface epithelia. It is not yet known what happens to estuarine fish subject to steep salinity variations along a ~6 hour tidal cycle. This study aimed at determining the unidirectional fluxes of Na^+ and Ca^{2+} in *F. heteroclitus* and *O. mykiss* during gradual salinity increase along 6 hours, simulating the flow tide. The results have indicated that the estuarine euryhaline killifish (*F. heteroclitus*) and the euryhaline freshwater rainbow trout (*O. mykiss*) display distinct patterns of modulation of their ionic fluxes when faced with the stress of fast increase in salinity. *F. heteroclitus* raises its influx and efflux of Na^+ , maintaining the homeostasis of this ion in the plasma and whole body. This result is in accordance with the widely reported capacity of this species to tolerate salinity fluctuations in its natural habitat. Ca^{2+} fluxes have indicated that *F. heteroclitus* tends to eliminate Ca^{2+} (secretory net flux) to the environment at all salinities above 10‰ seawater. In *O. mykiss*, gradual increase in salinity led to the loss of precise homeostasis of both Na^+ and Ca^{2+} , with increased plasma values, explained by absorptive net fluxes. As the rainbow trout is not regularly submitted to increased salinity in its natural environment, it is not able to rapidly (within hours) activate changes in unidirectional fluxes in order to ensure ionic homeostasis in saline water.

1 INTRODUÇÃO

Os teleósteos marinhos são hipo-osmóticos a água do mar e as espécies dulcícolas são hiper-osmóticas ao seu ambiente. Para serem hipo-osmóticas, as espécies marinhas secretam sal e para serem hiper-osmóticas as espécies dulcícolas absorvem sal do ambiente (revisado em Evans, 1993; Jobling, 1995). Muitos teleósteos marinhos e dulcícolas são eurihalinos, possuindo grande capacidade de tolerar amplas variações de salinidade, possivelmente interrompendo e até revertendo os fluxos unidirecionais de íons através dos epitélios de interface entre animal e ambiente (Gordon, 1963; Potts & Evans, 1967; Bath & Eddy, 1979; Perry & Flik, 1988; Wood & Marshall, 1994; Goss et al., 1998; Marshall, 2003; Wood & Laurent, 2003).

Medidas dos fluxos iônicos unidirecionais no animal inteiro ou em células isoladas de epitélios de transporte podem indicar de maneira precisa qual a magnitude dos fluxos unitários de íons, e os fluxos que estão acarretando as eventuais modificações resultantes no líquido extra-celular (p. ex. Van Der Heijden et al., 1999; Reid et al., 2003; Wood & Laurent, 2003).

Os principais mecanismos moleculares responsáveis pelos fluxos iônicos no epitélio branquial de teleósteos são diferentes em animais marinhos e dulcícolas. Para a secreção de sal nas brânquias de teleósteos marinhos o Na^+ , K^+ e Cl^- são transportados através da isoforma secretora do co-transportador NKCC localizado na membrana basolateral das células de cloreto juntamente com a Na^+, K^+ -ATPase. Estas células possuem condutância elevada ao Cl^- na região apical (canais de cloreto - CFTR) ao mesmo tempo em que o Na^+ passa do sangue para a água pela via paracelular entre as células de cloreto e células

acessórias (Evans, 1993; Jobling, 1995; Marshall & Bryson, 1998; Evans et al., 1999; Russel, 2000; Marshall, 2002; Marshall et al., 2002).

Para a absorção de sal nas brânquias de teleósteos dulcícolas o Na^+ é absorvido através de canais na membrana apical, acoplado energeticamente à secreção de H^+ pela H^+ -ATPase e através do trocador Na^+/H^+ . Na membrana basolateral o Na^+ é movido para o sangue através da Na^+, K^+ -ATPase. O Cl^- entra na célula acoplado com o HCO_3^- (trocador de ânions) e vai para o sangue por canais de Cl^- (CFTR) na membrana basolateral (Evans, 1993; Jobling, 1995; Perry, 1997; Wilson et al., 2000; Marshall, 2002). O Ca^{2+} é absorvido por canais apicais e na membrana basolateral é retirado ativamente da célula em direção ao sangue através de Ca^{2+} -ATPase e através de um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ impulsionado pelo gradiente eletroquímico do Na^+ gerado pela Na^+, K^+ -ATPase nos teleósteos dulcícolas e marinhos (Flik et al., 1993; Perry, 1997; Marshall & Bryson, 1998; Van Der Heijden et al., 1999; Marshall, 2002).

Não se sabe ao certo o que ocorre com peixes estuarinos sujeitos à variação de salinidade com o ciclo de maré de aproximadamente 6 horas. O teleósteo estuarino *Fundulus heteroclitus* sobrevive a água do mar e a água doce por longo período de tempo (12 horas, 7 dias, 14 dias), modulando o influxo e o efluxo de Na^+ e Cl^- e alterando a presença e expressão de transportadores nas células de cloreto branquiais (Marshall et al., 2002; Katoh et al., 2003; Richards et al., 2003; Wood & Laurent, 2003). Estudos realizados utilizando *F. heteroclitus* exposto à água doce por 1 hora mostraram a redução na secreção de NaCl e nos fluxos passivos de íons (Marshall, 2003). No entanto, não há resultados indicando possíveis modulações nos transportadores e nos fluxos iônicos com aumento gradual de salinidade ao longo de 6 horas, simulando a maré enchente.

Peixes eurihalinos são modelos adequados para estudar alterações nos fluxos iônicos unidirecionais. O “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, família Cripinodontidae é uma espécie extremamente eurihalina que vive em planícies de maré e estuários ao longo da costa norte americana, onde está sujeita a variações diárias de salinidade. Esta espécie, bem como outras espécies do gênero *Fundulus*, tolera alterações abruptas na salinidade da água sobrevivendo em salinidades entre 0 ‰ e 120 ‰ (Feldmeth & Waggoner III, 1972; Griffith, 1974). *F. heteroclitus* tem sido muito estudado para determinação de mecanismos básicos da osmorregulação de telósteos eurihalinos (Jacob & Taylor, 1983; Marshall et al., 1999; Marshall et al., 2000; Daborn et al., 2001; Katoh et al., 2003; Marshall, 2003; Wood & Laurent, 2003).

Além da espécie estuarina *F. heteroclitus*, um outro modelo amplamente estudado de peixe eurihalino é a truta arco-íris. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é uma espécie dulcícola, eurihalina que tolera salinidades próximas a 24 ‰ em aclimação gradual (Richards et al., 2003). Os salmonídeos em geral são amplamente estudados quanto aos seus mecanismos de transporte de íons branquiais, sendo excelentes modelos de teleósteos dulcícolas para estudos da transição entre absorção em água doce e secreção na água salgada (Gordon, 1963; Perry & Flik, 1988; Perry & Laurent, 1989; Perry et al., 1996; Galvez et al., 2002; Reid et al., 2003; Hawkings et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi preencher a lacuna na literatura, determinando fluxos unidirecionais de Na^+ e Ca^{2+} no peixe inteiro (*F. heteroclitus* e *O. mykiss*) durante a elevação gradual da salinidade ao longo de 6 horas simulando o ciclo de maré em ambiente estuarino. Os resultados foram analisados comparativamente entre as espécies, sob a hipótese de que a espécie eurihalina

dulcícola *O. mykiss* e a espécie eurihalina estuarina residente *F. heteroclitus* poderiam apresentar diferentes padrões na modulação do fluxo iônico frente ao estresse da rápida elevação da salinidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Exemplares adultos de *Fundulus heteroclitus* ($2,7 \pm 0,08$ cm de comprimento) foram coletados nos estuários de Antigonish, Nova Scotia, Canadá e Hampton, New Hampshire, EUA e foram levados para McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá onde foram mantidos em tanques de 500 L abastecidos com água de salinidade 10% da água do mar ($\sim 3,5\%$), temperatura ambiente, e constante aeração. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial floculada (Wardley Total Tropical Gourmet Flake Blend, Hartz Mountain Corp., EUA) e camarões salgados e congelados (San Francisco Bay Bre, EUA).

Exemplares de *Oncorhynchus mykiss* ($169,6 \pm 10,6$ cm de comprimento) foram obtidos de fornecedores comerciais (Humber Springs Trout Hatchery, Orangeville, Ontário, Canadá) e foram em seguida levados para McMaster University, onde foram mantidos em tanque estoque de 500 L com água doce, aeração constante e temperatura de 15 °C. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Martin Mills Inc., Canadá).

Experimentos de Fluxo Unidirecional de Na^+ e Ca^{2+}

Após aclimação às condições laboratoriais foi realizada a determinação dos fluxos unidirecionais de Na^+ e Ca^{2+} no corporal de *F. heteroclitus* e *O. mykiss* utilizando os radioisótopos $^{22}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Na}^+$ e $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Influxo

Os animais foram submetidos à elevação gradual de salinidade para simular a subida da maré no ambiente natural. Trinta e seis exemplares de *F. heteroclitus* foram transferidos do tanque estoque para tanques de 2 L com água de salinidade 10% da água do mar (AM) (~3,5‰), e 36 exemplares de *O. mykiss* para tanques com 4 L de água doce. Após 1 hora em AM 10%, 6 exemplares de *F. heteroclitus* foram sacrificados para verificação do influxo nesta salinidade e 30 exemplares foram transferidos para salinidade AM 20% (~7‰). Ao final de 1 hora, 6 exemplares foram sacrificados e os 24 restantes foram transferidos para AM 40% (~14‰). Ao completar 1 hora em AM 40% o mesmo procedimento foi aplicado e 18 animais foram transferidos para AM 60% (~21‰), onde permaneceram por 1 hora. Em seguida 12 animais foram transferidos para AM 80% (~28‰) e após 1 hora 6 animais foram sacrificados como descrito anteriormente. Finalmente, os 6 animais restantes foram transferidos para 100% (~35‰) da água do mar, sendo sacrificados após exposição de 1 hora. A absorção do radioisótopo (influxo) do meio foi determinada pela sua detecção no corpo do animal. Os influxos dos íons Na^+ e Ca^{2+} foram determinados em um mesmo experimento, para cada espécie. As medidas do influxo de Ca^{2+} foram realizadas após 7 dias da realização do experimento após o total desaparecimento da radioatividade emitida pelo $^{24}\text{Na}^+$.

Para a determinação dos fluxos de Na^+ em *F. heteroclitus*, foram adicionados 24 μCi de $^{24}\text{Na}^+$ (Departamento de Física, McMaster University) em 2 L de água de salinidade 10%, 20%, 40% ou 60%, 32 μCi em água 80% e 40 μCi em 100%. Para a determinação do fluxo de Ca^{2+} foram adicionados 30 μCi de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Perkin Elmer, EUA) em 2 L de água com salinidade 10%, 20%, 40% e 60%, 40 μCi em água 80% e 50 μCi em 100%. Para a determinação dos fluxos de Na^+ em *O. mykiss* foram adicionados 24 μCi de $^{24}\text{Na}^+$ em 4 L de água doce, 20%, 40% e 60%, 32 μCi em água de salinidade 80% e 40 μCi em 100% da água do mar. Para o fluxo de Ca^{2+} foram adicionados 30 μCi de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 4 L de água doce, 20%, 40% e 60%, 40 μCi em água de salinidade 80% e 50 μCi em 100% da água do mar. A elevação na concentração dos radioisótopos foi devido à elevação na concentração dos íons/sal nas salinidades crescentes, a fim de manter a atividade específica calculada para cada condição. A atividade específica foi calculada usando a concentração do íon radioativo mensurado na água dividido pela concentração de íon frio (Tab. 1).

Os isótopos foram adicionados e misturados rapidamente à água na qual os animais eram expostos. Amostras de água de 5 mL foram coletadas no início (tempo 0 min) e no final do período de determinação dos fluxos de 30 min para $^{24}\text{Na}^+$ e 60 min para $^{45}\text{Ca}^{2+}$, para cada salinidade. Imediatamente após a coleta das amostras de água, os animais foram banhados em meio não radioativo por 5 minutos e em seguida anestesiados, pesados e amostras de sangue das *O. mykiss* foram coletadas. Os animais foram processados para medida da radioatividade total do corpo e da concentração de íons Na^+ e Ca^{2+} no corpo e no plasma dos animais.

Para determinação do $^{24}\text{Na}^+$ na água, as amostras de 5 mL foram lidas imediatamente após o experimento em contador gama e para a determinação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foram adicionados 10 mL de ACS (“Aqueous Counting Scintillant”) (Amersham Biosciences, EUA), um fluoróforo de cintilação específico para contagem de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em água.

Para determinação do total de radioatividade ($^{24}\text{Na}^+$) em todo o corpo de *F. heteroclitus*, os animais inteiros foram medidos diretamente no contador gama Minaxi Autogamma 5000 counter (Packard Instruments, EUA). Para determinar a radioatividade do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a concentração corporal dos íons em *F. heteroclitus*, as carcaças foram digeridas em 4 volumes de 1 N HNO_3 e aquecidas a 60 °C por 24 h. Para determinar o $^{24}\text{Na}^+$ e o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a concentração dos íons corporais em *O. mykiss*, as carcaças foram homogeneizadas em liquidificador com adição do mesmo volume de água e em seguida sub-amostras do homogeneizado foram digeridas como descrito anteriormente para *F. heteroclitus*. Após o período de digestão as amostras de ambas as espécies foram centrifugadas a 600 xg por 10 min em centrífuga Sigma 4K15 (Sigma, Alemanha). Cinco mL do sobrenadante foram adicionados a 10 mL do UltimaGold AB (Perkin Elmer, EUA), um fluoróforo de cintilação específico para contagem de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em digestão ácida, e foram medidos em contador beta Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, EUA). O sobrenadante restante e as amostras de plasma de *O. mykiss* foram utilizados para determinar as concentrações totais dos íons Na^+ e Ca^{2+} em Fotômetro de Absorção Atômica, SpectrAA, 220FS (Varian, Canadá). A determinação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na água e no corpo/plasma dos animais ocorreu após 7 dias, período necessário para que não houvesse emissão de radioatividade pelo $^{24}\text{Na}^+$.

As taxas de influxo em $\mu\text{mol/kg/h}$ foram calculadas utilizando o valor total de radioatividade por peixe em CPM (*counts* por minuto) para $^{24}\text{Na}^+$ e DPM (desintegração por mL) para $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dividido pela atividade específica calculada em cada salinidade, sendo o resultado dividido pelo peso (g) de cada peixe e multiplicado por 1000 para converter o peso em kg.

Efluxo

A perda de radioisótopos do corpo do animal para o meio foi diretamente medida pela taxa unidirecional de efluxo. Os radioisótopos $^{22}\text{Na}^+$ e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foram diluídos em salina de Cortland e injetados intraperitonealmente (1 $\mu\text{L/g}$ de peixe) com seringa Hamilton de 50 μL (*F. heteroclitus*) e 100 μL (*O. mykiss*) em peixes retirados dos tanques estoque. Após a injeção de 0.05 $\mu\text{Ci/g}$ de $^{22}\text{Na}^+$ (n=6), e de 1,0 $\mu\text{Ci/g}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (n=6), para ambos os radioisótopos, os exemplares de *F. heteroclitus* foram colocados em câmaras individuais com 250 mL de água com salinidade 10% da água do mar (mesma salinidade do estoque). Os exemplares de *O. mykiss* foram injetados com 0,05 $\mu\text{Ci/g}$ de $^{22}\text{Na}^+$ (n=6), e 0,2 $\mu\text{Ci/g}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (n=6) e em seguida foram colocados em câmaras individuais com 3 L de água doce. Após um período de equilíbrio do radioisótopo no organismo dos animais, de 1 hora para *F. heteroclitus* e 4 horas para *O. mykiss*, iniciou-se a transferência dos animais individualmente para salinidades mais elevadas como já descrito anteriormente para o experimento de influxo. Para determinar o efluxo dos íons em *F. heteroclitus* e *O. mykiss* durante os experimentos foram coletadas amostras de água em cada salinidade no tempo zero, 15 min, 30 min, 45 min e 60 min. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e a radioatividade ($^{22}\text{Na}^+$ e

$^{45}\text{Ca}^{2+}$) e a concentração dos íons Na^+ e Ca^{2+} no corpo e no plasma dos animais foram determinadas utilizando protocolo descrito anteriormente.

As taxas de efluxo em $\mu\text{mol/kg/h}$ foram calculadas baseadas no valor de radioatividade medido na amostra de água e na atividade específica no animal após as exposições. A atividade específica plasmática para o Na^+ na truta e para o Ca^{2+} no “killifish” e na truta foi calculada baseada no valor total de CPM por mL de LEC utilizando volume permutável dos íons Na^+ estimado em 37% (Eddy e Bath, 1979); e volume permutável de Ca^{2+} estimado neste trabalho em ~4,5% para “killifish” e ~39% para truta. A atividade específica de Na^+ no “killifish” foi calculada com base na concentração de Na^+ do corpo todo do animal. O cálculo da atividade específica foi realizado dividindo o valor em CPM pela concentração dos íons plasmáticos ou no corpo todo. A perda de íons Na^+ e Ca^{2+} do animal para a água foi calculada dividindo o valor total de CPM/DPM perdido na água de cada salinidade ao longo de 60 min pela atividade específica dos íons no animal. O valor final do efluxo foi calculado em cada salinidade ao longo dos 60 min de exposição, multiplicando o valor dos íons perdidos para a água em cada salinidade pelo tempo de exposição à salinidade (60 min), em seguida dividindo o valor obtido pelo peso de cada animal em gramas, multiplicando ainda o valor final por 1000 para converter o peso em kg. O fluxo resultante dos íons foi calculado pela diferença entre o influxo e o efluxo.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Comparações entre o mesmo parâmetro (influxo, efluxo, concentração de Na^+ e Ca^{2+} plasmáticos e no corporal do animal) após exposição às diferentes

salinidades (água doce ou 10%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% da água do mar) foram avaliados através de ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey com $p < 0,05$.

Tabela 1: Concentração iônica das águas utilizadas nos experimentos de fluxo iônico unidirecional de íons Na^+ e Ca^{2+} , em água doce (AD) e nas diversas concentrações da água do mar (AM).

	Na^+ (mmol/l)	Cl^- (mmol/l)	Ca^{2+} (mmol/l)
AD	$0,7 \pm 0,1$ (n=6)	$1,1 \pm 0,1$ (n=7)	$1,4 \pm 0,1$ (n=4)
10%AM	$73,3 \pm 4,8$ (n=5)	$104,3 \pm 14,0$ (n=5)	$3,8 \pm 0,1$ (n=4)
20%AM	$109,9 \pm 8,3$ (n=9)	$133,4 \pm 8,5$ (n=7)	$5,6 \pm 0,3$ (n=4)
40%AM	$203,1 \pm 12,1$ (n=10)	$212,0 \pm 11,1$ (n=7)	$8,0 \pm 0,5$ (n=4)
60%AM	$270,1 \pm 11,5$ (n=9)	$303,2 \pm 5,9$ (n=7)	$9,9 \pm 0,5$ (n=4)
80%AM	$354,8 \pm 13,1$ (n=9)	$412,6 \pm 7,9$ (n=7)	$12,9 \pm 0,7$ (n=4)
100%AM	$439,1 \pm 12,9$ (n=10)	$534,6 \pm 7,2$ (n=7)	$15,9 \pm 0,8$ (n=4)

3 RESULTADOS

Após os experimentos de determinação dos fluxos unidirecionais dos íons Na^+ e Ca^{2+} durante elevação gradual da salinidade da água simulando a subida de maré no ambiente natural, pode-se observar diferenças no padrão de regulação dos fluxos em *F. heteroclitus*, espécie eurihalina estuarina e *O. mykiss*, espécie eurihalina dulcícola.

Fluxos Unidirecionais de Na^+

F. heteroclitus apresentou aumento dos fluxos tanto de entrada quanto de saída do íon Na^+ (Fig. 1A) com aumento da salinidade ao longo das 6 horas de experimento. O influxo de Na^+ aumentou na salinidade de 60% da água do mar ($11550 \pm 1076 \mu\text{mol/kg/h}$) e manteve-se estabilizado em 80% da água do mar ($9261 \pm 1344 \mu\text{mol/kg/h}$) e água do mar 100% (AM) ($9963 \pm 1344 \mu\text{mol/kg/h}$). O efluxo aumentou a partir de 80% ($9163 \pm 1289 \mu\text{mol/kg/h}$), mantendo valor elevado em AM ($13243 \pm 1677 \mu\text{mol/kg/h}$) quando comparado a 10%, 20% e 40% da água do mar. O fluxo resultante em AM e 10% da água do mar foi negativo, prevalecendo o efluxo de Na^+ (secreção de íons pelos epitélios, do LEC para o meio externo). Nas salinidades de 20%, 40% e 60% da água do mar, o fluxo resultante de Na^+ foi positivo indicando uma maior absorção resultante de íons pelos epitélios, para o LEC (influxo). Na salinidade de 80% da água do mar, o efluxo e o influxo apresentaram-se em equilíbrio, praticamente sem fluxo resultante. Os resultados indicam que *F. heteroclitus* aumenta gradualmente os fluxos unidirecionais (influxo e efluxo) de íons Na^+ com aumento da salinidade. O

fluxo resultante em 10% e 100% da água do mar indicou secreção e em 20%, 40% e 60% indicou absorção de Na^+ .

A concentração de íons Na^+ corporal (Fig. 1B) não apresentou alterações significativas frente à elevação da salinidade, indicando elevada capacidade de homeostase do Na^+ extracelular mesmo com alterações em seus fluxos unidirecionais.

O. mykiss submetida à água doce (AD) ($615 \pm 101 \mu\text{mol/kg/h}$) apresentou influxo de Na^+ reduzido quando comparado as salinidades de 20% ($2262 \pm 224 \mu\text{mol/kg/h}$) e 40% da água do mar ($3234 \pm 215 \mu\text{mol/kg/h}$). (Fig. 2A). Nas salinidades de 60% ($33610 \pm 3646 \mu\text{mol/kg/h}$), 80% ($24866 \pm 2346 \mu\text{mol/kg/h}$) da água do mar e AM ($27953 \pm 1014 \mu\text{mol/kg/h}$), observou-se um aumento drástico do influxo de Na^+ comparado aos valores em AD, 20% e 40% da água do mar (valores entre 615 - $3240 \mu\text{mol/kg/h}$), indicando entrada do íon para o corpo do animal. O efluxo de Na^+ foi aumentado em AM ($5396 \pm 1014 \mu\text{mol/kg/h}$) e em 80% ($3581 \pm 571 \mu\text{mol/kg/h}$) quando comparado a AD ($1883 \pm 335 \mu\text{mol/kg/h}$) e 20% da água do mar ($2359 \pm 480 \mu\text{mol/kg/h}$). O fluxo resultante em AD foi negativo, prevalecendo o efluxo de Na^+ . Nas salinidades de 20% e 40%, observou-se equilíbrio entre influxo e efluxo, com fluxo resultante praticamente inexistente, e em 60%, 80% e AM o fluxo resultante de Na^+ foi positivo indicando influxo resultante (absorção) para o LEC. Os resultados indicam que a partir da salinidade de 60% da água do mar *O. mykiss* apresentou perda da capacidade de manutenção do equilíbrio entre efluxo e influxo, absorvendo uma grande quantidade de Na^+ do ambiente hiper-salino, perdendo a capacidade de regulação do Na^+ após exposição por 1 hora em salinidade de 60% da água do mar.

A concentração de Na^+ no plasma e corporal de *O. mykiss* apresentou aumento com a elevação de salinidade. A concentração plasmática de Na^+ (Fig. 2B) em AM ($187,5 \pm 1,7$ mmol/l) foi elevada comparada aos valores em AD ($148,7 \pm 4,5$ mmol/l), 20% ($153,5 \pm 2,3$ mmol/l), 40% ($152,8 \pm 3,3$ mmol, l^{-1}), 60% ($154,9 \pm 3,4$ mmol/l) e 80% ($164,8 \pm 3,3$ mmol/l) da água do mar. Em 80% da água do mar os valores de Na^+ foram maiores do que em AD. A concentração de Na^+ corporal do animal (Fig. 2C) elevou-se em AM ($63,0 \pm 3,0$ mmol/kg) comparando-se a AD ($37,5 \pm 2,7$ mmol/kg), 20% ($37,1 \pm 2,3$ mmol/kg), 40% ($40,3 \pm 0,8$ mmol/kg), 60% ($43,2 \pm 1,3$ mmol/kg) e 80% ($45,8 \pm 1,5$ mmol/kg) da água do mar. Observou-se aumento significativo das concentrações de Na^+ plasmáticas e corporal de *O. mykiss* principalmente em AM indicando a perda de capacidade de manter a homeostase deste íon em curto período de tempo em salinidade elevada.

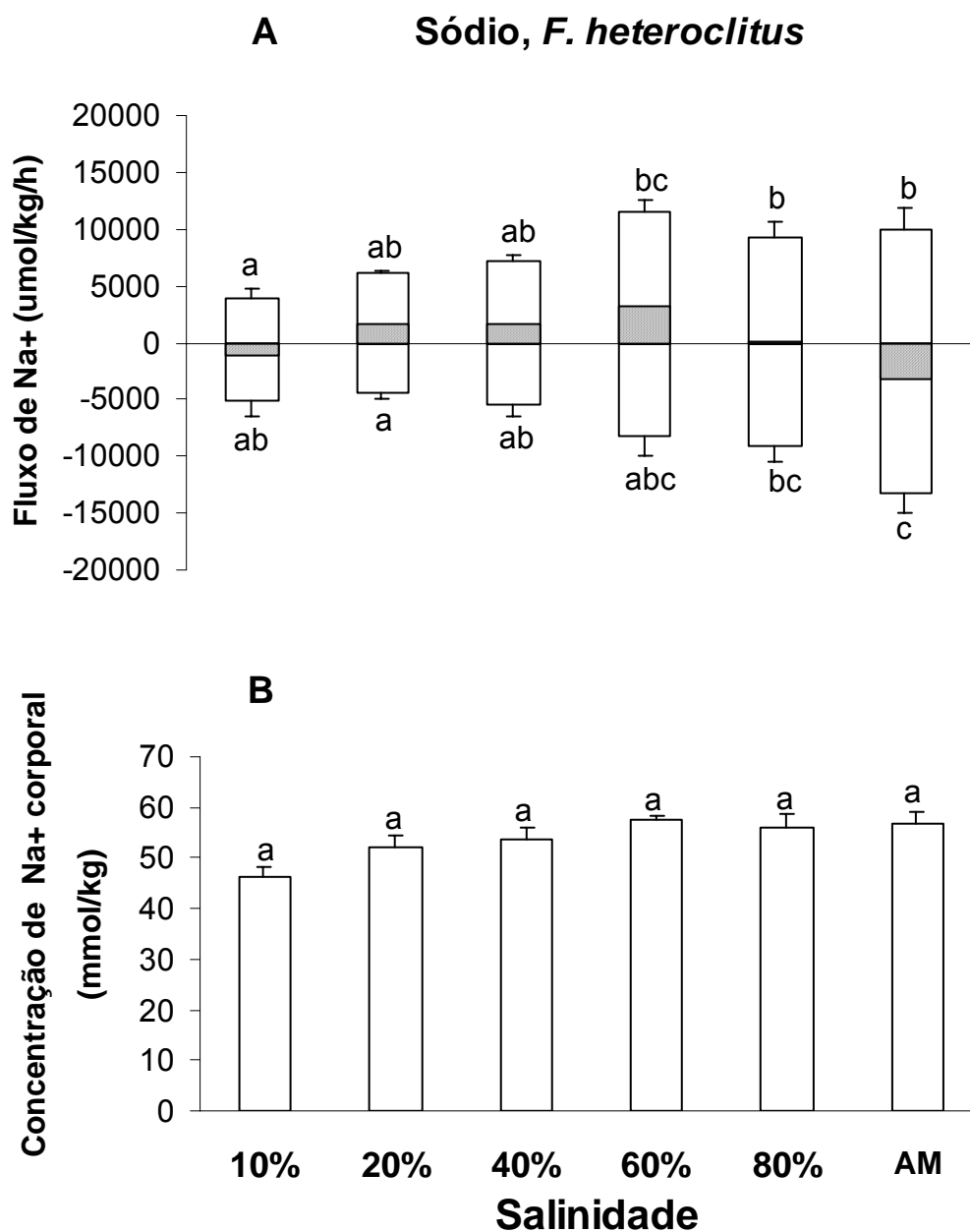


Figura 1: Fluxos e concentração corporal de Na⁺ em *F. heteroclitus* submetido à elevação da salinidade da água. **A)** Influxo de Na⁺ (valores positivos) (n=6) e efluxo de Na⁺ (valores negativos) (n: 5-10) (média ± erro padrão, µmol/kg/h). Barras preenchidas representam a diferença aritmética (fluxo resultante) entre a média das taxas de influxo (positivo) e efluxo (negativo). **B)** Concentração de Na⁺ corporal (n: 6-25) (média ± erro padrão, mmol/kg). AM, água do mar. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0.05) entre as salinidades de exposição.

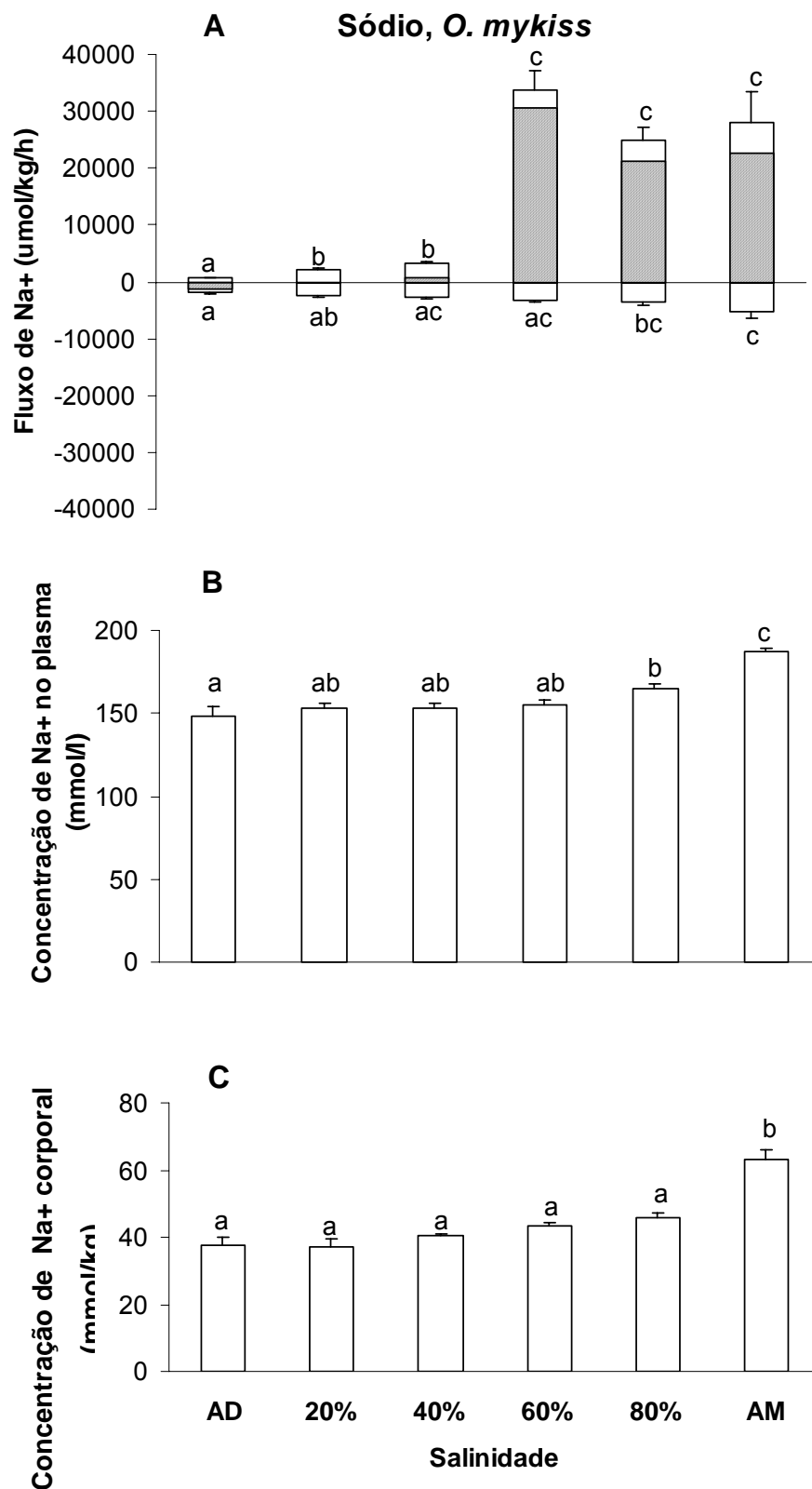


Figura 2 ; concentração do plasma e corporal de Na⁺ em *O. mykiss* submetido à elevação da salinidade da água. **A)** Influxo de Na⁺ (valores positivos) (n=6) e efluxo de Na⁺ (valores negativos) (n: 5-10) (média ± erro padrão, μmol/kg/h). Barras preenchidas representam a diferença aritmética (fluxo resultante) entre a média das taxas de influxo (positivo) e efluxo (negativo). **B)** Concentração de Na⁺ no plasma (n: 6-18) (média ± erro padrão, mmol/l) **C)** Concentração de Na⁺ corporal (n: 6-12) (média ± erro padrão, mmol/kg). AD, água doce; AM, água do mar. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0.05) entre as salinidades de exposição.

Fluxos Unidirecionais de Ca^{2+}

F. heteroclitus apresentou aumento do influxo do íon Ca^{2+} (Fig. 3A) em AM ($318 \pm 77,9 \mu\text{mol/kg/h}$) comparado ao influxo em 10% ($90,8 \pm 17,1 \mu\text{mol/kg/h}$) e na salinidade de 80% da água do mar ($358 \pm 53,6 \mu\text{mol/kg/h}$) comparado às salinidades reduzidas de 10%, 20% ($158 \pm 19,1 \mu\text{mol/kg/h}$), 40% ($171 \pm 31,1 \mu\text{mol/kg/h}$) e 60% da água do mar ($158 \pm 26,6 \mu\text{mol/kg/h}$). O efluxo teve resultado contrário ao influxo, com valor elevado na salinidade de 10% ($1154 \pm 61,1 \mu\text{mol/kg/h}$), reduzindo-se gradativamente com o aumento da salinidade (20%: $736,5 \pm 59,7$; 40%: $517,1 \pm 131,7$; 60%: 462 ± 100 ; 80%: 451 ± 103 ; AM: $383 \pm 121 \mu\text{mol/kg/h}$). O fluxo resultante em todas as salinidades foi negativo e levou ao efluxo de íons Ca^{2+} , prevalecendo à secreção de íons pelos epitélios do LEC para o meio externo (Figura 3A). Os resultados indicam que *F. heteroclitus* tem maior perda de Ca^{2+} em salinidades reduzidas e possui tendência ao equilíbrio entre secreção e absorção em salinidades elevadas ao longo de 6 horas de experimento.

A concentração corporal de íons Ca^{2+} (Fig. 3B) apresentou valores menores em AM ($571 \pm 35,3 \text{ mmol/kg}$) e 80% da água do mar ($534 \pm 15,1 \text{ mmol/kg}$) quando comparados aos valores em 10% ($691 \pm 22,2 \mu\text{mol/kg}$), 40% ($787 \pm 12,5 \text{ mmol/kg}$) e 60% da água do mar ($777 \pm 32,6 \mu\text{mol/kg}$). A concentração em 40% e 60% foi aumentada quando comparada à concentração em 10% e 20% da água do mar ($605 \pm 42,1 \text{ mmol/kg}$). Devido ao pequeno volume de sangue coletado, a concentração de Ca^{2+} plasmático foi verificada apenas nos animais utilizados para o experimento de efluxo, apresentando em água do mar ao final do experimento de 6 horas, valor de $7,2 \pm 0,8 \text{ mmol/l}$ ($n=5$).

O. mykiss apresentou aumento gradual do influxo de Ca^{2+} acompanhando o aumento da salinidade (Fig. 4A). Em AM, o influxo foi aumentado para $263 \pm 70,7$ $\mu\text{mol/kg/h}$ quando comparado ao influxo em AD ($35,7 \pm 5,8$ $\mu\text{mol/kg/h}$), 20% ($66,2 \pm 13,4$ $\mu\text{mol/kg/h}$), 40% ($85,5 \pm 10,4$ $\mu\text{mol/kg/h}$) e 60% ($91,1 \pm 13,9$ $\mu\text{mol/kg/h}$) da água do mar. Em 80% ($108 \pm 10,6$ $\mu\text{mol/kg/h}$), 60% e 40% da água do mar, ocorreu aumento significativo no influxo de Ca^{2+} comparado ao influxo em AD. O efluxo de Ca^{2+} não variou com a elevação da salinidade, mantendo seus valores ao longo de todo experimento próximos a $8,0$ $\mu\text{mol/kg/h}$ (Fig. 4A). O fluxo resultante de Ca^{2+} em todas as salinidades foi positivo, sempre a favor da absorção dos íons da água para o interior do corpo do animal (influxo).

A concentração de Ca^{2+} no plasma de *O. mykiss* (Fig. 4B) apresentou elevação significativa em AM ($4,7 \pm 0,1$ mmol/l) quando comparada a AD ($3,6 \pm 0,1$ mmol/l) e às salinidades reduzidas de 20% ($3,0 \pm 0,2$ mmol/l), 40% ($3,3 \pm 0,2$ mmol/l), 60% ($3,2 \pm 0,1$ mmol/l) e 80% ($3,7 \pm 0,3$ mmol/l) da água do mar. A concentração corporal de Ca^{2+} de *O. mykiss* (Fig. 4C) não apresentou diferenças significativas entre as salinidades de exposição, mantendo seus valores próximos a 250 mmol/kg. A elevação nas concentrações plasmáticas acompanhou a elevação do influxo de Ca^{2+} nos animais expostos a salinidades mais elevadas.

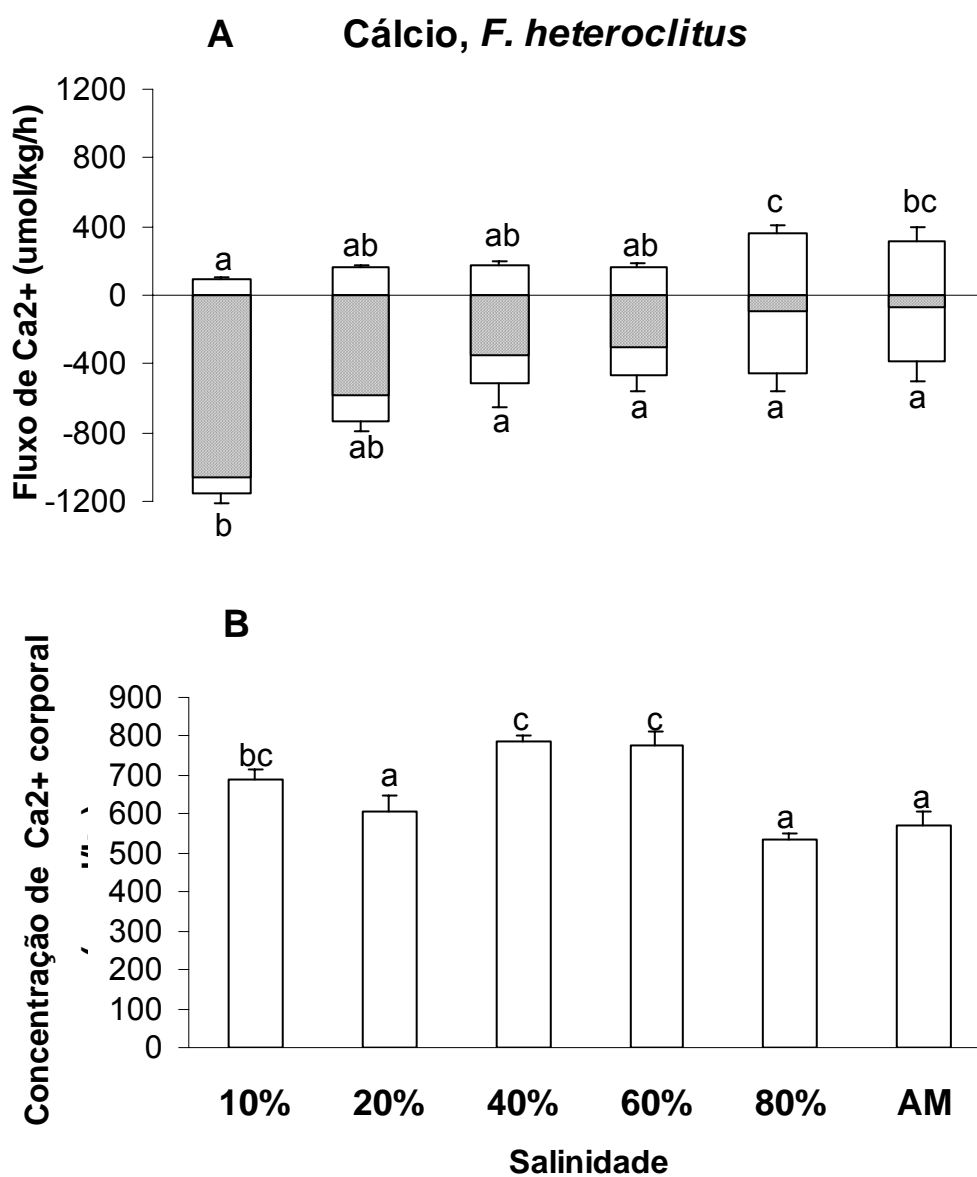


Figura 3: Fluxos e concentração corporal de Ca^{2+} em *F. heteroclitus* submetido à elevação da salinidade da água; **A)** Influxo de Ca^{2+} (valores positivos) (n=6) e efluxo de Ca^{2+} (valores negativos) (n=6) (média \pm erro padrão, $\mu\text{mol/kg/h}$). Barras preenchidas representam a diferença aritmética (fluxo resultante) entre a média das taxas de influxo (positivo) e efluxo (negativo). **B)** Concentração de Ca^{2+} corporal (n: 6-13) (média \pm erro padrão, mmol/kg). AM, água do mar. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as salinidades de exposição.

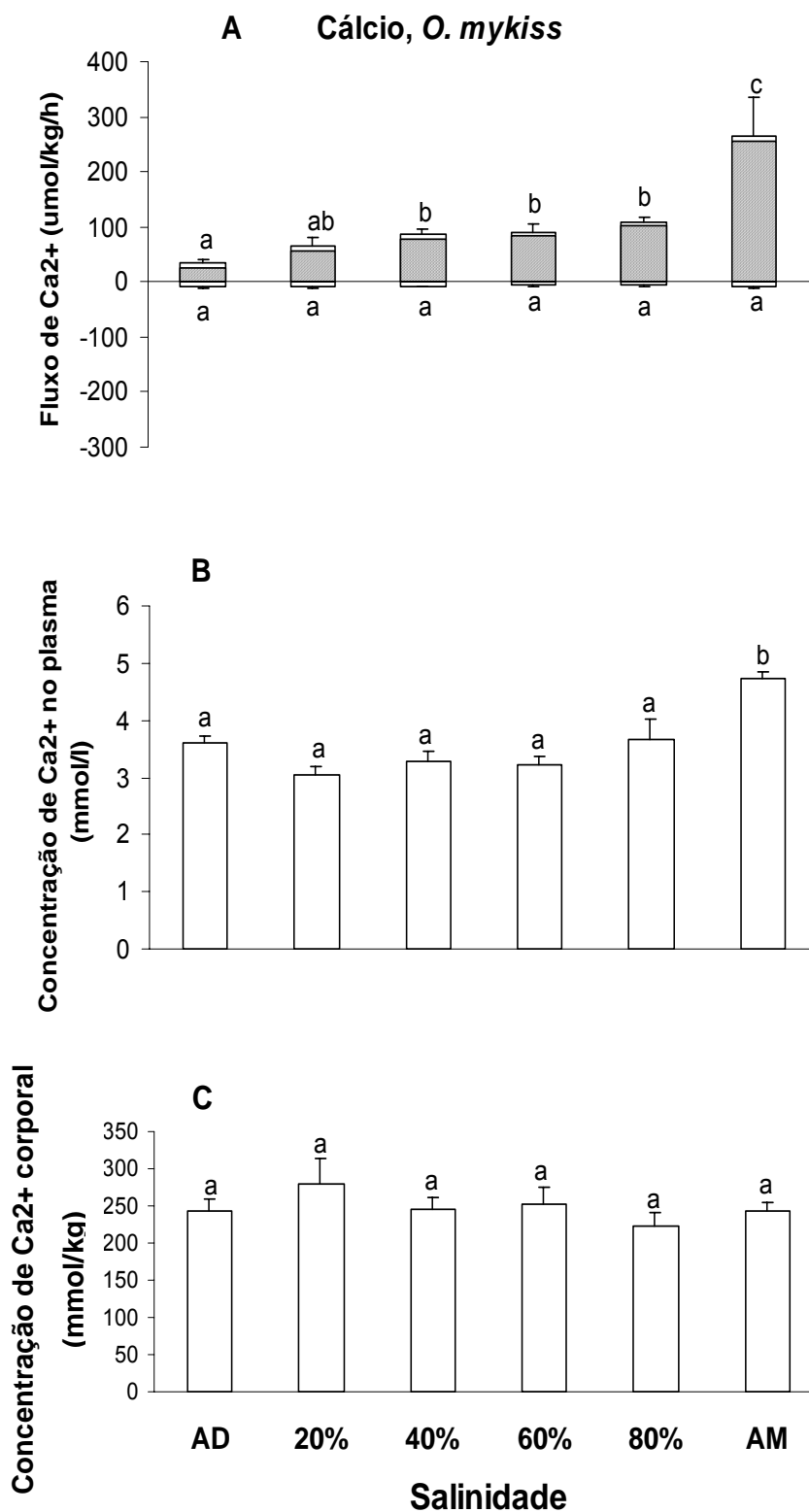


Figura 4: Fluxos, concentração do plasma e corporal de Ca^{2+} de *O. mykiss* submetido à elevação da salinidade da água; **A)** Influxo de Ca^{2+} (valores positivos) ($n=6$) e efluxo de Ca^{2+} (valores negativos) ($n=6$) (média \pm erro padrão, $\mu\text{mol/kg/h}$). Barras preenchidas representam a diferença aritmética (fluxo resultante) entre a média das taxas de influxo (positivo) e efluxo (negativo). **B)** Concentração de Ca^{2+} no plasma ($n=6$) (média \pm erro padrão, mmol/l) **C)** Concentração de Ca^{2+} corporal ($n: 6-12$) (média \pm erro padrão, mmol/kg). AD, água doce; AM, água do mar. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0.05$) entre as salinidades de exposição.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os fluxos unidirecionais (influxo e efluxo) de Na^+ aumentaram gradualmente com a elevação da salinidade para *F. heteroclitus*. Para *O. mykiss*, o influxo aumentou abruptamente nas salinidades de 60%, 80% e água do mar e o efluxo apresentou pequena elevação ao final de 6 horas de experimento em água do mar. Os fluxos iônicos unidirecionais em *F. heteroclitus* podem ser aumentados por estresse durante a manipulação e anestesia dos animais (Wood & Marshall, 1994; Wood & Laurent, 2003). Para minimizar este efeito os animais foram colocados *overnight* nos tanques onde seriam depois realizados os experimentos, para prévia aclimação ao novo ambiente. Os peixes não foram anestesiados para a injeção dos radioisótopos.

Espécies eurihalinas como *F. heteroclitus* e *O. mykiss* geralmente conseguem manter a osmolalidade e a concentração dos íons frente a gradientes osmóticos alterando os fluxos iônicos, a permeabilidade para água e íons através dos principais órgãos responsáveis pela osmorregulação (Gordon, 1959; 1963). Os menores fluxos de entrada e saída de Na^+ verificados em água doce e nas salinidades reduzidas (ambiente hipo-osmótico) em ambas as espécies é ocasionado principalmente por alterações branquiais e renais. As brânquias reduzem a permeabilidade aos íons (Potts & Evans, 1967; Evans, 1993; Wood & Marshall, 1994; Jobling, 1995), aumentam a secreção de muco (Wood & Marshall, 1994; Perry, 1997), reduzem condutância celular e paracelular ao Na^+ devido a alterações nas junções *tight* entre as células branquiais, reduzem os mecanismos de secreção e aumentam os mecanismos de absorção de Na^+ (Potts

& Evans, 1967; Wood & Marshall, 1994; Marshall et al. 1995; Marshall & Bryson, 1998; Marshall et al., 2000) O rim, por sua vez, realiza conservação de Na^+ para evitar perda para o ambiente e auxilia na manutenção de suas concentrações (Evans, 1993; Wood & Marshall, 1994; Jobling, 1995). O intestino atua na absorção e secreção de água (Potts & Evans, 1967; Evans, 1993; Jobling, 1995).

Os valores do influxo e efluxo de Na^+ para *F. heteroclitus* em salinidade 10% da água do mar apresentou valores semelhantes aos obtidos anteriormente para esta espécie (Wood & Laurent, 2003). Em água do mar (ao final das 6 horas) os valores do influxo ($\sim 9900 \mu\text{mol/kg/h}$) e efluxo ($\sim 13300 \mu\text{mol/kg/h}$) de Na^+ foram inferiores aos valores verificados em *F. heteroclitus* anteriormente por outros autores (valores entre ~ 20000 - $40000 \mu\text{mol/kg/h}$) (Mota et al., 1966; Potts & Evans, 1967; Pic, 1978; Wood & Marshall, 1994; Wood & Laurent, 2003), possivelmente devido ao menor tempo de exposição (dias ou horas) à água do mar realizado neste estudo quando comparado aos estudos anteriores.

Em *F. heteroclitus*, o fluxo resultante para secreção de Na^+ em 10% da água do mar foi semelhante à resposta obtida para esta espécie exposta à água doce (Wood & Marshall, 1994; Patrick & Wood, 1999). Animais expostos a água doce por períodos mais longos (entre 8 horas e 14 dias) apresentaram resultados contrários, com influxo aumentado (Scott et al., 2004a). Os mecanismos que atuam em água doce e em água diluída (10%) ocasionam redução da taxa de ingestão de água (Wood & Marshall, 1994) e redução da permeabilidade aos íons Na^+ (Potts & Evans, 1967), e são responsáveis pelos menores fluxos em 10% da água do mar quando comparados às salinidades mais elevadas de 60%, 80% e água do mar.

A elevação da salinidade ao longo de 6 horas levou ambas as espécies ao aumento dos fluxos unidirecionais de Na^+ acompanhado de uma possível elevação na ingestão de sal vindo da água (dados não avaliados), o que explica o fluxo resultante no sentido de absorção verificado nas salinidades mais elevadas (Bath & Eddy, 1979; Eddy & Bath, 1979; Evans, 1993; Jobling, 1995; Wood & Marshall, 1994). A absorção de Na^+ verificada em *O. mykiss* nas salinidades entre 40‰ da água do mar e água do mar 100‰ pode estar sendo influenciada principalmente pela entrada passiva de NaCl vindo do ambiente. Em *F. heteroclitus*, espécie marinha-estuarina, a absorção de Na^+ pode estar sendo influenciada principalmente pela expansão da região apical das células de cloreto branquiais em água do mar diluída devido a ausência ou presença reduzida da H^+ -ATPase apical nesta espécie (Wood & Marshall, 1994; Marshall et al., 1997; Kirschner, 2004).

O fluxo resultante para secreção de NaCl em *F. heteroclitus* em água do mar pode ser explicado pela possível ativação de sistemas de secreção dos íons Na^+ principalmente nas brânquias para secretar o excesso de sal ingerido com elevação da permeabilidade ao Na^+ e elevação da taxa de ingestão de água do mar característico de peixes marinhos (Potts & Evans, 1967; Evans, 1993; Jobling 1995; Zadunaisky et al., 1995; Marshall et al., 1999; Daborn et al., 2001). Além de alterações na permeabilidade e na taxa de ingestão de água, mecanismos moleculares e hormonais são ativados para realizar secreção de sal em água do mar em curto período de tempo. A Na^+, K^+ -ATPase aumenta sua atividade (Vonck et al., 1998; Marshall et al., 1999; Scott et al., 2004b); o cortisol responde rapidamente à salinidade elevada aumentando a expressão do kCFTR (Marshall et al., 1999).

Os fluxos unidirecionais de Na^+ para *O. mykiss* em água doce, 20% e 40% da água do mar indicaram secreção de Na^+ para o ambiente hipó-osmótico em água doce e 20% e absorção em 40%. Em 60%, 80% e 100% da água do mar ocorreu perda da capacidade de regular o Na^+ , com influxo aumentando drasticamente indicando a total perda da capacidade de manutenção da homeostase do Na^+ . Como esta espécie é dulcícola e não está sujeita periodicamente a elevação de salinidade como *F. heteroclitus*, a mesma demonstrou não possuir mecanismos de ativação da regulação do Na^+ em curto período de tempo. Outra espécie dulcícola eurihalina, a tilápia *Oreochromis mossambicus*, quando exposta a água doce, 25%, 50%, 75% e 100% da água do mar por período de 4 horas apresentou resultados semelhante aos verificados para *O. mykiss*, com influxo aumentado nas salinidades elevadas e fluxo resultante para absorção de Na^+ da água (Vonck et al., 1998). Experimentos anteriores realizados com *O. mykiss* apresentaram valores semelhantes nos fluxos de Na^+ , mostraram equilíbrio entre o influxo e efluxo de Na^+ em salinidades elevadas, porém os animais foram aclimatados gradualmente a elevação de salinidade ao longo de horas ou dias (Bath & Eddy, 1979; Eddy & Bath, 1979; Perry & Laurent, 1989; Postlethwaite & McDonald, 1995).

A elevação drástica do influxo de Na^+ observada para *O. mykiss* em altas salinidades é esperada pela enorme disponibilidade de sal externo, uma vez que o animal dispõe de mecanismos ativos de absorção de sal nas suas brânquias. Em salinidades mais elevadas (60%, 80% e água do mar), ocorre maior entrada passiva de íons, aumento na taxa de ingestão de água, perda osmótica de água e a redução na taxa de produção de urina. Em consequência, ocorre aumento nas

concentrações dos íons plasmáticos e corporais, como verificado na Figura 2 (Gordon, 1959; Bath & Eddy, 1979; Eddy & Bath, 1979; Vonck et al., 1998).

Em *F. heteroclitus* não observou-se variação significativa nas concentrações de Na^+ corporal indicando que esta espécie eurihalina estuarina tem maior capacidade de manter a homeostase deste íon frente a elevação gradual de salinidade comparada a *O. mykiss*, uma espécie eurihalina dulcícola.

As concentrações de Na^+ plasmático e corporal da truta *O. mykiss* indicam um aumento gradual da concentração de Na^+ com elevação da salinidade acompanhando o aumento no influxo, atingindo seus maiores valores ao final das 6 horas, quando os animais encontravam-se expostos à 100% da água do mar. Resultados semelhantes de aumento gradual foram observados nas concentrações de Na^+ em *O. mykiss* expostas a 2/3 água do mar por 8 horas e em *Oreochromis mossambicus* expostas a água do mar, 25%, 50%, 75% e água do mar (Bath & Eddy, 1979; Vonck et al., 1998).

Os fluxos unidirecionais (influxo e efluxo) de Ca^{2+} responderam de forma bastante distinta à elevação gradual da salinidade em *F. heteroclitus* e *O. mykiss*. Em *F. heteroclitus*, o influxo foi elevado com aumento da salinidade e o efluxo reduzido, com fluxo resultante em todas as salinidades no sentido de secreção de Ca^{2+} . *O. mykiss* apresentou elevação do influxo de Ca^{2+} com aumento da salinidade, apresentando valor mais alto em água do mar. O efluxo não apresentou variações significativas com a elevação da salinidade, e fluxo resultante indicou forte absorção de Ca^{2+} em todas as salinidades.

Os fluxos unidirecionais de Ca^{2+} para *F. heteroclitus* em água doce foram medidos anteriormente, com influxo deste íon sendo reduzido (valores entre 32,5 e 10,5 $\mu\text{mol/kg/h}$) quando comparado ao influxo verificado neste trabalho (valores

entre 90 e 358 $\mu\text{mol/kg/h}$) (Mayer-Gostan et al., 1983). Este trabalho é o primeiro a relatar os fluxos de Ca^{2+} em água do mar diluída (10%-40% da água do mar) no *killifish*. O influxo em 10% da água do mar é mais elevado do que o verificado em água doce, possivelmente pela maior concentração de Ca^{2+} na água. Experimentos utilizando o epitélio opercular e as brânquias de *F. heteroclitus* expostos a água doce mostraram absorção de Ca^{2+} prevalecendo seu influxo, resultado contrário ao aqui verificado em água do mar diluída (salinidade de 10% da água do mar) para o animal inteiro (McCormick et al., 1992; Marshall et al., 1992; Wood & Marshall, 1994).

O efluxo elevado para *F. heteroclitus* nas salinidades reduzidas de 10% e 20% pode ser resultado de uma perda excessiva do radioisótopo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante as primeiras 2 horas de experimento, indicando a necessidade de um período de equilíbrio no corpo do animal maior do que o aplicado que foi de 1 hora. Após a transferência para salinidade de 40% da água do mar (~ 4 horas após a injeção do radioisótopo) o efluxo foi estabilizado, indicando um maior equilíbrio. O fluxo resultante de secreção de Ca^{2+} observado em todas as salinidades seria resultado da tendência a entrada de Ca^{2+} vindo do ambiente rico neste íon principalmente através do sistema digestivo, e sua provável secreção através do rim (Jobling, 1995). O transporte de Ca^{2+} brânquial é bem conhecido em teleósteos dulcícolas (Jobling, 1995; Perry, 1997; Flik et al., 1993; Marshall & Bryson, 1998; Vonck et al., 1998; Marshall, 2002), porém poucos autores relatam o transporte de Ca^{2+} branquial em espécies marinhas-estuarinas (Marshall & Bryson, 1998; Marshall, 2002), havendo a necessidade de estudos mais detalhados para explicar estes mecanismos.

A concentração corporal de Ca^{2+} de *F. heteroclitus* apresentou valores muito elevados (entre 534 e 788 mmol/kg), indicando grande participação do Ca^{2+} presente no esqueleto do animal sobre a concentração corporal medida. Sendo assim, os valores corporais de Ca^{2+} obtidos não são representativos das alterações dos fluxos unidirecionais e não auxiliam na interpretação dos resultados do influxo e efluxo. O Ca^{2+} plasmático seria mais representativo neste experimento, porém devido ao pequeno volume de sangue obtido, não foi possível a verificação das concentrações plasmáticas em todas as condições experimentais, obtendo-se valor apenas nos animais em água do mar ao final do experimento de efluxo. Este valor final (7,2 mmol/l) foi maior que o verificado para espécies marinhas e dulcícolas eurihalinas (Evans, 1993; Flik et al., 1986), indicando que apesar do fluxo resultante para secreção de Ca^{2+} em água do mar, ocorre elevação da sua concentração plasmática provavelmente pelo grande aporte vindo do ambiente rico neste íon como já mencionado anteriormente.

A absorção de Ca^{2+} foi observada em *O. mykiss* em todas as salinidades. Normalmente ocorre absorção de Ca^{2+} em teleósteos dulcícolas, com o influxo maior que o efluxo (Perry & Flik, 1988; Flick et al., 1993; Jobing, 1995; Marshall & Bryson, 1998). Trutas em água doce apresentaram absorção Ca^{2+} , corroborando os resultados aqui obtidos, porém com valores menores para os fluxos devido ao tempo maior de monitoramento de ~16-18 horas contra apenas 6 horas neste experimento e a quantidade de radioatividade utilizada (Perry & Flik, 1988).

A tilápia *Oreochromis mossambicus*, quando submetida a água doce, apresentou fluxos unidirecionais de Ca^{2+} semelhantes aos aqui verificados para *O. mykiss* com absorção de Ca^{2+} (Flik et al., 1985;1993; Vonck et al., 1998). Quando *Oreochromis mossambicus* foi submetida por período de 4 horas a água

doce, 25%, 50%, 75% e 100% da água do mar, apresentou maior influxo e fluxo resultante para absorção em todas as salinidades, corroborando os resultados obtidos para *O. mykiss*.

A absorção de Ca^{2+} observada em *O. mykiss* em água doce pode ser explicada pelo controle do Ca^{2+} extracelular realizado principalmente pelo hormônio prolactina. Este hormônio ativa a absorção de Ca^{2+} em ambientes com pouco Ca^{2+} (em água doce, ou água do mar muito diluída), levando a manutenção das concentrações plasmáticas (Flik et al., 1989; Flik et al., 1993; Vonck et al., 1998). Sendo assim, em água com salinidade mais elevada (20%, 40%, 60%, 80% e 100% da água do mar), a absorção de Ca^{2+} e o aumento na concentração plasmática não podem ser atribuídos à prolactina, mas sim pelo aumento do influxo de Ca^{2+} como verificado nos resultados obtidos neste estudo e em estudos anteriores com tilápia, e pela maior disponibilidade de Ca^{2+} no meio externo (Tab. 1) (Flik et al., 1986; Vonck et al., 1998). As alterações no influxo podem ocorrer devido a maior disponibilidade de Ca^{2+} no ambiente, o que gera um elevado gradiente entre o meio externo e a célula, ocasionando entrada passiva de Ca^{2+} (Mayer-Gostan et al., 1983; Marshall & Bryson, 1998; Marshall, 2002).

A elevação do influxo de Ca^{2+} nos animais expostos a salinidades mais elevadas foi acompanhada pela elevação nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} de *O. mykiss* principalmente em água do mar, indicando a perda de capacidade de regulação dos íons Ca^{2+} quando os expostos a salinidades elevadas. Resposta semelhante à elevação de salinidade foi encontrada para *Oreochromis mossambicus* que também elevou o Ca^{2+} plasmático com a elevação da salinidade (Flik et al., 1986; Vonck et al., 1998). A concentração de Ca^{2+} corporal não variou com a elevação da salinidade e o mesmo foi observado para

Oreochromis mossambicus (Vonck et al., 1998), indicando que a variação plasmática não afetou o Ca^{2+} total do animal provavelmente pela grande quantidade de Ca^{2+} presente no esqueleto.

O transporte branquial (células de cloreto) dos íons Na^+ e Ca^{2+} é acoplado e similar nas espécies dulcícolas e marinhas (Marshall & Bryson, 1998; Marshall, 2002). As trocas entre Na^+ e Ca^{2+} contribuem para a absorção de Ca^{2+} associado em alguns casos ao aumento no número das células de cloreto e na atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase (Marshall, 2002). O transporte de Ca^{2+} e Na^+ ocorre via transcelular e paracelular. Na via transcelular, o Ca^{2+} é absorvido pelas brânquias da água para o sangue passivamente, devido ao gradiente eletroquímico por canais apicais e ativamente da célula para o sangue através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da Ca^{2+} -ATPase. O Na^+ é absorvido por canais apicais e é transportado para o sangue pela Na^+, K^+ -ATPase (Flik et al., 1984; Flik et al., 1986; 1993; Verbost et al., 1994; Jobling, 1995; Perry, 1997; Marshall & Bryson, 1998; Marshall, 2002). Em água do mar ocorre aumento do influxo de Na^+ e Ca^{2+} e aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase gerando, o gradiente eletroquímico ativador do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da Ca^{2+} -ATPase basolaterais, aumentando a absorção de Ca^{2+} (Flik et al., 1997; Marshall & Bryson, 1998; Vonck et al., 1998; Marshall, 2002). O aumento do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ em trutas *O. mykiss* submetidas a 70‰ da água do mar levou ao aumento do transporte transepitelial de Ca^{2+} (Verbost et al., 1994).

Em conclusão, observamos que *F. heteroclitus*, espécie eurihalina estuarina, mantém as taxas de influxo e efluxo de Na^+ aumentados com a elevação da salinidade ao longo de 6 horas, assegurando a homeostasia deste íon, com manutenção de suas concentrações corporais. Este resultado confirma a

capacidade que esta espécie possui de tolerar a elevação da salinidade diária com a maré enchente em seu ambiente natural. Os fluxos de Ca^{2+} indicam que *F. heteroclitus* tende a secretar Ca^{2+} para o ambiente mesmo com ambiente rico em Ca^{2+} (salinidades mais elevadas) compensando sua entrada passiva. Para *O. mykiss* uma espécie eurihalina, porém dulcícola, 6 horas de elevação gradual da salinidade levaram a perda da capacidade de manutenção das concentrações de Na^+ e Ca^{2+} plasmáticas devido ao aumento no influxo de ambos os íons. Como esta espécie não é submetida regularmente a elevação de salinidade em seu ambiente natural, não consegue ativar de forma eficaz mecanismos que mantenham a homeostase dos íons Na^+ e Ca^{2+} em água do mar em curto período de tempo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bath, R.N., Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. J. Exp. Biol. 83, 193-202.
- Daborn, K., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S., 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Biol. 204, 1889-1899.
- Eddy, F.B., Bath, R.N., 1979. Ionic regulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) adapted to fresh water and dilute sea water. J. Exp. Biol. 83, 181-192.
- Evans, D.H., 1993. The Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. J. Exp. Zool. 283, 641-652.

- Feldmeth, C.R., Waggoner III, J.P., 1972. Field measurements of tolerance to extreme hypersalinity in the California "killifish", *Fundulus parvipinnis*. *Copeia* 592-594.
- Flik, G., Fenwick, J.C., Wendelaar Bonga, S.E., 1989. Calcitropic actions of prolactin in freshwater North American eel (*Anguilla rostrata* LeSueur). *Am. J. Physiol.* 257, R74-R79.
- Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Fenwick, J.C., 1984. Ca^{2+} -dependent phosphatase and Ca^{2+} -dependent ATPase activities in plasma membranes of eel gill epithelium. II. Evidence for transport of high-affinity Ca^{2+} -ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 9–16.
- Flik, G., Fenwick, J.C., Kolar, Z., Mayer-Gostan, N., Wendelaar Bonga, S.E., 1985. Whole-body calcium flux rates in cichlid teleost fish *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater. *Am. J. Physiol.* 249, R432-R437.
- Flik, G., Fenwick, J.C., Kolar, Z., Mayer-Gostan, N., Wendelaar Bonga, S.E., 1986. Effects of low ambient calcium levels on the whole-body Ca^{2+} flux rates and internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Biol.* 120, 249-264.
- Flik, G., Kaneko, T., Greco, A.M., Li, J., Fenwick, J.C., 1997. Sodium dependent ion transporters in trout gills. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 385–396.
- Flik, G., Van Der Velden, J.A., Dechering, K.J., Verbost, P.M., Schoenmakers, T.J.M., Kolar, Z., Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: A Review. *J. Exp. Zool.* 265, 356–365.

- Galvez, F., Reid, S.D., Hawkings, G.S., Goss, G.G., 2002. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 282, R658 – R668.
- Gordon, M.S., 1959. Ionic regulation in the brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Exp. Biol.* 36, 227-252.
- Gordon, M.S., 1963. Chloride exchanges in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) adapted to different salinities. *Biol. Bull.* 124, 45-54.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill Morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 107–115.
- Griffith, R.W., 1974. Environment and salinity tolerance in the genus *Fundulus*. *Copeia* 319 – 331.
- Hawkings, G.S., Galvez, F., Goss, G.G., 2004. Seawater acclimation causes independent alterations in Na^+/K^+ - and H^+ -ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.* 207, 905-912.
- Jacob, W.F., Taylor, M.H., 1983. The time course of seawater acclimation in *Fundulus heteroclitus* L. *J. Exp. Zool.* 228, 33-39.
- Jobling, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London.
- Katoh, F., Hyodo, S., Kaneko, T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branquial mitochondria-rich cells of “killifish” *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 206, 793-803.
- Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207, 1439-1452.

- McCormick, S.D., Hasegawa, S., Hirano, T., 1992. Calcium uptake in the skin of a freshwater teleost. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 3635–3638.
- Marshall, W.S., 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264–283.
- Marshall, W.S., 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 95 –105.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., 1998. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 97-106.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Luby, T., 2000. Control of epithelial Cl^- secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 203, 1897–1905.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Wood, C.M., 1992. Calcium transport by isolated skin of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 166, 297–316.
- Marshall, W.S., Lynch, E.M., Cozzi, R.R.F., 2002. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the “killifish” *Fundulus heteroclitus* to sea water. *J. Exp. Biol.* 205, 1265-1273.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Midelfart, A., Hamilton, W.F., 1995. Low conductance anion channel activated by cyclic AMP in teleost Cl^- secreting cells. *Am. J. Physiol.* 268, R963–R969.
- Marshall, W.S., Emberley, T.R., Singer, T.D., Bryson, S.E., McCormick, S.D., 1999. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine

- teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. J. Exp. Biol. 202, 1535–1544.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Darling, P., Whitten, C., Patrick, M., Wilkie, M., Wood, C.M., Buckland-Nicks, J., 1997. NaCl transport and ultrastructure of opercular epithelium from a freshwater-adapted euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Zool. 277, 23–37.
- Mayer-Gostan, N., Bornancin, M., DeRenzeis, G., Naon, R., Yee, J.A., Shew, R.L., Pang, P.K.T., 1983. Extraintestinal calcium uptake in the “killifish”, *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Zool. 227, 329–338.
- Motais, R., Garcia-Romeu, F., Maetz, J., 1966. Exchange diffusion effect and euryhalinity in teleosts. J. Gen. Physiol. 50, 391–442.
- Patrick, M.L., Wood, C.M., 1999. Ion and acid-base regulation in freshwater mummichog (*Fundulus heteroclitus*): a departure from the standard model for freshwater teleosts. Comp. Biochem. Physiol. 122A, 445–456.
- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. Ann. Rev. Physiol. 59, 325–347.
- Perry, S.F., Flik, G., 1988. Characterization of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Am. J. Physiol. 254, R491–R498.
- Perry, S.F., Laurent, P., 1989. Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentrations: contribution of the branchial chloride cell. J. Exp. Biol. 147, 147–168.
- Perry, S.F., Reid, S.G., Wankiewicz, E., Iyer, V., Gilmour, K.M., 1996. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. Physiol. Zool. 69(6), 1419–1441.

- Pic, P., 1978. A comparative study of the mechanism of Na^+ and Cl^- excretion by the gill of *Mugil capito* and *Fundulus heteroclitus*: effects of stress. J. Comp. Physiol. 123, 155-162.
- Postlethwaite, E.K., McDonald, D.G., 1995. Mechanisms of Na^+ and Cl^- regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. J. Exp. Biol. 198, 295-304.
- Potts, W.T.W., Evans, D.H., 1967. Sodium and chloride balance in the "killifish" *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull. 133, 411-425.
- Reid, S.D., Hawkings, G.S., Galvez, F., Goss, G.G., 2003. Localization and characterization of phenamil-sensitive Na^+ influx in isolated rainbow trout gill epithelial cells. J. Exp. Biol. 206, 551-559.
- Richards, J.G., Semple, J.W., Bystriansky, J.S., Schulte, P.M., 2003. Na^+/K^+ -ATPase α -isoform AMitching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. J. Exp. Biol. 206, 4475-4486.
- Russel, M.J., 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. Physiol. Rev. 80, 211-276.
- Scott, G.R., Richards, J.G., Forbush, B., Isenring, P., Schulte, P.M., 2004a. Changes in gene expression in gills of the euryhaline "killifish" *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. Am. J. Physiol. 287, C300-C309.
- Scott, G.R., Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M., Schulte, P.M., 2004b. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. J. Exp. Biol. 207, 3399-3410.
- Van Der Heijden, A.J.H., Verbost, P.M., Bijvelds, M.J.C., Atsma, W., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. Effects of sea water and stanniectomy on branchial

- Ca²⁺ handling and drinking rate in eel (*Anguilla anguilla* L.). J. Exp. Biol. 202, 2505-2511.
- Verbost, P.M., Schoenmakers, T.H.J.M., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 1994. Kinetics of ATP- and Na⁺-gradient driven Ca²⁺ transport in basolateral membranes from gills of freshwater and seawater-adapted tilapia. J. Exp. Biol. 186, 95–108.
- Vonck, A.P.M.A., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1998. Sodium and calcium Balance in mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, raised at different salinities. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 441–449.
- Wilson, J.M., Laurent, P., Tufts, B.L., Benos, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Randall, D.J., 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to of ion-transport protein localization. J. Exp. Biol. 203, 2297-2310.
- Wood, C.M., Marshall, W.S., 1994. Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the common “killifish”, *Fundulus heteroclitus* – a euryhaline estuarine teleost. Estuaries 17(1A), 34-52.
- Wood, C.M., Laurent, P., 2003. Na⁺ versus Cl⁻ transport in the “killifish” after rapid salinity transfer. Biochim. Biophys. Acta 1618, 106–119.
- Zadunaisky, J.A., Cardona, S., Au, L., Roberts, D.M., Fisher, E., Lowenstein, B., Cragoe Jr, E.J., 1995. Chloride transport activation by osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. J. Membr. Biol. 143, 207–217.

CONCLUSÕES GERAIS

Durante a transição entre hiper-regulação (em salinidade 5‰) e a hipo-regulação (em salinidade 35‰) as duas espécies de baiacus apresentaram mecanismos de regulação osmo-iônica semelhantes. Demonstraram o mesmo padrão de resposta às salinidades, com tendência a redução nas concentrações plasmáticas osmóticas e iônicas em 5‰ e controle do conteúdo de água das células, a despeito da ligeira diluição do plasma.

Quanto à participação de transportadores específicos na osmorregulação destes peixes estuarinos, o NKCC atuou na secreção de sal em 35‰ e na regulação do conteúdo de água das células musculares e no hematócrito de *S. testudineus*. A Na^+, K^+ -ATPase branquial dos baiacus mostrou desempenhar seu papel tanto na hiper- quanto na hipo-regulação por não sofrer alterações no sinal imunocitoquímico. Esta enzima mostrou não ser um dos motivos para a maior tolerância de *S. testudineus* à água do mar diluída. De forma geral, as diferenças no conteúdo de triglicerídeos e atividade ATPásica total das brânquias e rins, e a atuação do NKCC no conteúdo de água do músculo e do hematócrito podem explicar parcialmente a maior capacidade de *S. testudineus* de tolerar a diluição da água do mar durante a maré baixa quando comparado a *S. greeleyi*.

Mostrou-se que *S. testudineus* possui notável capacidade de tolerar flutuações de salinidades no seu ambiente dispondo de um tipo raro de rim. Seu rim anterior possui glomérulos e túbulos renais cercados por tecido hematopoiético. O rim posterior é constituído apenas de um grande duto coletor convoluto denominado de duto mesonéfrico. Com estes resultados esta tese

contribuiu também com dados morfológicos de um órgão crucial para a osmorregulação dos peixes, e mesmo assim muito pouco estudado.

Frente à elevação gradual de salinidade simulando o ciclo de maré enchente, *F. heteroclitus* confirmou sua capacidade de tolerar a elevação diária da salinidade com subida da maré em seu ambiente natural e *O. mykiss* perdeu a capacidade de manutenção das concentrações plasmáticas de Na^+ e Ca^{2+} . Este resultado mostra que a espécie estuarina ativa mecanismos de osmorregulação para manutenção da homeostase dos íons Na^+ e Ca^{2+} durante a transição gradual entre hiper- e hipo-regulação do plasma, o que não acontece com a espécie dulcícola, por esta não ser submetida regularmente a elevação de salinidade em seu ambiente natural. Em conclusão, este trabalho preencheu lacunas do conhecimento sobre a morfologia e fisiologia da osmorregulação em peixes estuarinos, abrangendo um grande número de metodologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borski, R.J., Yoshikawa, J.S.M., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Zabetian, C., Bern, H.A., Grau, E.G., 1994. Effects of environmental salinity on pituitary growth hormone content and cell activity in the euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 483-494.
- Claireaux, G., Audet, C., 2000. Seasonal changes in the hypo-osmoregulatory ability of brook charr: the role of environmental factors. J. Fish Biol. 56, 347 - 373.
- Daborn, K., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S., 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Biol. 204, 1889–1899.
- Evans, D.H., 1993. The Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Feldmeth C.R, Waggoner III J.P., 1972. Field measurements of tolerance to extreme hypersalinity in the California killifish, *Fundulus parvipinnis*. Copeia 592-594.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI Teleostei (5). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Galvez, F., Reid, S.D., Hawkings G.S., Goss G.G., 2002. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. Am. J. Physiol. 282, R658–R668.
- Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A., Mayer-Gostan, N., 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. J. Fish Biol. 47, 865-876.

- Griffith, R.W., 1974. Environment and salinity tolerance in the genus *Fundulus*. *Copeia* 319–331.
- Hawkings, G.S., Galvez, F., Goss, G.G., 2004. Seawater acclimation causes independent alterations in Na^+/K^+ - and H^+ -ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.* 207, 905–912.
- Jacob, W.F., Taylor, M.H., 1983. The time course of seawater acclimation in *Fundulus heteroclitus* L. *J. Exp. Zool.* 228, 33–39.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na^+,K^+ -ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282, 290–300.
- Jobling, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London.
- Katoh, F., Hyodo, S., Kaneko, T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branquial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 206, 793–803.
- Kelly, S.P., Woo, N.Y.S., 1999. The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *J. Fish Biol.* 55, 732–750.
- Mann, K.H., Lazier, J.R.N., 1991. *Dynamics of Marine Ecosystems - Biological-Physical Interactions in the Oceans*. Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Marshall, W.S., 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 95–105.

- Marshall, W.S., Bryson, S.E., Luby, T., 2000. Control of epithelial Cl⁻ secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Biol. 203, 1897–1905.
- Marshall, W.S., Emberley, T.R., Singer, T.D., Bryson, S.E., McCormick, S.D., 1999. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. J. Exp. Biol. 202, 1535–1544.
- Odum, E.P., 1988. Ecologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Odum, H.T., 1994. Ecological and General Systems: An Introduction to Systems Ecology. Revised edition. University Press of Colorado, Colorado.
- Perry, S.F., Flik, G., 1988. Characterization of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Am. J. Physiol. 254, R491–R498.
- Perry, S.F., Laurent, P., 1989. Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentrations: contribution of the branchial chloride cell. J. Exp. Biol. 147, 147–168.
- Perry, S.F., Reid, S.G., Wankiewicz, E., Iyer, V., Gilmour, K.M., 1996. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. Physiol. Zool. 69(6), 1419–1441.
- Prodócimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 262, 243–253.
- Prodócimo, V., Freire, C.A., 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to seawater dilution during ebb tide: a field experiment. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 37, 1–5.

- Reid, S.D., Hawkings, G.S., Galvez, F., Goss, G.G., 2003. Localization and characterization of phenamil-sensitive Na^+ influx in isolated rainbow trout gill epithelial cells. *J. Exp. Biol.* 206, 551-559.
- Richards, J.G., Semple, J.W., Bystriansky, J.S., Schulte, P.M., 2003. Na^+/K^+ -ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *J. Exp. Biol.* 206, 4475-4486.
- Sakamoto, T., Kozaka, T., Takahashi, A., Kawauchi, H., Ando, M., 2001. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture* 193, 347-354.
- Schmidt-Nielsen, K., 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. 5. ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Der Heijden, A.J.H., Verbost, P.M., Bijvelds, M.J.C., Atsma, W., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. Effects of sea water and stanniectomy on branchial Ca^{+2} handling and drinking rate in eel (*Anguilla anguilla* L.). *J. Exp. Biol.* 202, 2505-2511.
- Vendel, A.L., Spach, H.L., Lopes, S.G., Santos, C., 2002. Structure and dynamics of fish assemblages in a tidal creek environment. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 365–373.
- Wood, C.M., Laurent, P., 2003. Na^+ versus Cl^- transport in the intact killifish after rapid salinity transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 106 – 119.
- Wood, C.M., Pärt, P., 1997. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. *J. Exp. Biol.* 200, 1047-1059.
- Zadunaisky, J.A., 1996. Chloride cells and osmoregulation. *Kidney Int.* 49, 1563-1567.